

SÉRIE A, N° 351

N° D'ORDRE

1016

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. FRÉDÉRIC DIENERT

Ancien Élève de l'Institut national agronomique.

1^{re} THÈSE. — *Sur la fermentation du galactose et sur l'accoutumance des levures à ce sucre.*

2^e THÈSE. — *Propositions données par la Faculté.*

Soutenues le 20 mars 1900, devant la Commission d'examen.

Président : M. LIPPMANN,

Examineurs : MM. { DUCLAUX,
HALLER.

SCEAUX

IMPRIMERIE E. CHARAIRE

98-100, RUE HOUDAN, 98-100

1900

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

ACADÉMIE DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

MM.

DOYEN | DARBOUX, professeur. Géométrie supérieure.

PROFESSEUR }
HONORAIRE } HERMITE.

PROFESSEURS	DE LACAZE-DUTHIERS.	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	TROOST.	Chimie.
	LIPPMANN.	Physique.
	HAUTEFEUILLE	Minéralogie.
	BOUTY	Physique.
	APPELL	Mécanique rationnelle.
	DUCLAUX.	Chimie biologique.
	BOUSSINESQ.	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
	PICARD	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
	POINCARÉ.	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
	YVES DELAGE.	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	GASTON BONNIER . . .	Botanique.
	DASTRE.	Physiologie.
	DITTE.	Chimie.
	MUNIER-CHALMAS . . .	Géologie.
	GIARD.	Zoologie, Évolution des êtres organisés.
	WOLF.	Astronomie physique.
	KOENIGS.	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN.	Géographie physique.
GOURSAT.	Calcul différentiel et Calcul intégral.	
CHATIN	Histologie.	
PELLAT	Physique.	
HALLER	Chimie organique.	

PROFESSEURS ADJOINTS	{	PUISEUX.	Mécanique et Astronomie.
		RIBAN.	Chimie analytique.
		RAFFY.	Analyse et Mécanique.

SECRÉTAIRE | FOUSSEREAU.

SÉRIE A, N° 351

N° D'ORDRE

4016

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. FRÉDÉRIC DIENERT

Ancien Élève de l'Institut national agronomique.

1^{re} THÈSE. — *Sur la fermentation du galactose et sur l'accoutumance des levures à ce sucre.*

2^e THÈSE. — *Propositions données par la Faculté.*

Soutenues le 26 mars 1900, devant la Commission d'examen.

Président : M. LIPPMANN,

Examineurs : MM. { DUCLAUX,
HALLER.



SCEAUX

IMPRIMERIE E. CHARAIRE

98-100, RUE HOUDAN, 98-100

1900

A mon Maître,

MONSIEUR DUCLAUX

Professeur à la Sorbonne
et à l'Institut agronomique.

Hommage de mon plus profond respect et de mon dévouement.

A mon Maître et Ami,

MONSIEUR KAYSER

Chef des travaux au laboratoire des fermentations.

*Hommage respectueux, ainsi que mes remerciements
pour ses précieux conseils.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552206_0051

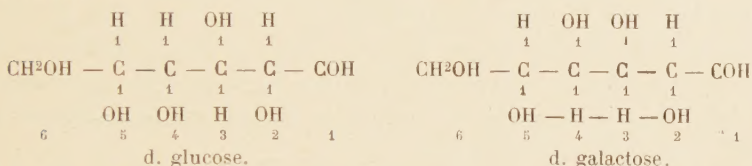
SUR LA FERMENTATION DU GALACTOSE

ET SUR L'ACCOUTUMANCE DES LEVURES A CE SUCRE

PAR FREDÉRIC DIENERT

HISTORIQUE

Le galactose est un hexose stéréoisomère du glucose. En effet, M. Fischer a établi pour ces deux sucres les formules suivantes :



Si on numérote ces deux formules de constitution d'après la nomenclature de Genève, on constate que le glucose diffère du galactose par un changement dans la position de l'oxhydrile OH lié au carbone 4.

Ces deux corps sont donc très voisins d'après leurs propriétés chimiques. Leurs propriétés physiques diffèrent assez de façon à rendre faciles leur distinction et leur séparation. Mais tandis qu'en employant ces mêmes propriétés physiques il est difficile d'éliminer les traces de l'un de ces corps souillant l'autre, les levures arrivent facilement à les distinguer et dans certains cas peuvent en permettre la purification.

Pendant longtemps on ignora que les levures pouvaient distinguer l'un de ces sucres et on avait cru que la fermentation du galactose devait suivre la même marche générale que celle du glucose. On pensait qu'une levure capable, dans certaines conditions, de décomposer le glucose en alcool et en acide carbonique pouvait dans les mêmes conditions opérer la décomposition du galactose en ces deux mêmes éléments. C'est en partant de cette idée qui semblait de toute logique qu'à un moment la question, si simple en apparence, de la fermentation alcoolique du galactose fut fort embrouillée.

Pasteur, en 1863, fut le premier qui aborda l'action de la levure sur le galactose qu'il désignait à cette époque sous le nom de lactose. En ensemençant une levure pure dans un milieu nutritif (eau de levure) additionné de galactose, il obtint, après l'action de la levure, de l'alcool, de la glycérine et de l'acide succinique. Pour Pasteur, le galactose était fermentescible. Malheureusement, à cette époque, la pureté des sucres n'était pas poussée à un très haut degré comme le démontrera plus tard Bourquelot. On ne pouvait donc pas affirmer à la suite des travaux de Pasteur que le *galactose pur* était décomposé sous l'influence de la levure en alcool et en acide carbonique. Le glucose qui souillait le galactose pouvait exercer une influence dans le cours de cette fermentation.

La méthode suivie par Pasteur était la plus correcte et la meilleure, comme nous le verrons par la suite. Elle permettait d'éviter l'action possible des microbes et même des mélanges de plusieurs espèces de levures.

Elle fut cependant peu suivie, exigeant une certaine habitude et la possession de cultures pures. Aussi la plupart des savants eurent-ils recours à un procédé très expéditif consistant à faire agir une certaine quantité de levure du commerce, levure impure, sur une solution de galactose dans l'eau. Ce procédé réussissait toujours avec le glucose; on pensa qu'il s'appliquerait également dans le cas du galactose. Même s'il se fût appliqué, on n'eût pu tabler des conclusions sur de telles expériences faites non avec une levure pure, mais avec une levure contaminée par un nombre plus ou moins grand de microbes. Tous les résultats obtenus en employant la levure du commerce ne sont donc pas à retenir. Aussi citerons-nous pour mémoire seulement et sans nous arrêter à leurs travaux très discordants, les noms de Fudakowski, Koch, Haydück. Sur ceux de Bourquelot et de Tollens et Stone, qui employèrent également la levure du commerce, nous dirons quelques mots plus tard.

Les expériences de Pasteur furent reprises par Von Lippmann et aboutirent au même résultat.

Kiliani et Herzfeld étudièrent également l'action de la levure de bière sur le galactose et employèrent aussi une levure pure, mais le premier remplaça l'eau de levure de Pasteur par de l'extrait de viande et le second par un mélange de phosphate de

chaux et d'asparagine. Dans ces deux milieux, probablement peu nutritifs pour leurs levures et peut-être aussi pour Kiliani à cause de l'espèce de levure qu'il employait, la levure ne décomposa pas le galactose en alcool et en acide carbonique.

C'est à ce moment qu'apparurent les résultats de M. Bourquelot, qui ont perdu depuis quelque temps de leur importance, mais qui ont eu le mérite d'appeler l'attention sur le degré de pureté du galactose du commerce.

En multipliant les cristallisations de galactose dans l'alcool, ce savant parvint à éliminer les traces de glucose qui souillent toujours ce sucre. En opérant avec du galactose pur du commerce (qui contient généralement 10 0/0 de glucose) et du galactose purifié par lui, M. Bourquelot obtint des résultats différents. Le galactose était fermentescible quand il était impur, et était inattaqué par la levure dès qu'il était exempt de glucose. Ce sucre fermentant semblait entraîner le galactose, de là la notion de fermentation par entraînement introduite dans la science à la suite de ces expériences¹.

Où on s'étonne dans les expériences de M. Bourquelot, c'est de voir que la levure du commerce qu'il emploie n'entre pas en putréfaction pendant les huit jours qu'elle reste en contact avec le galactose pur. Sans attacher une trop grande importance aux conclusions de cet auteur, je reviendrai sur ce travail dans le cours de mes recherches.

Le travail de M. Bourquelot amena MM. Tollens et Stone à étudier l'action de la levure sur le galactose.

Ces deux savants répétèrent les expériences de Bourquelot et, au lieu de dissoudre le galactose dans l'eau ils eurent l'idée de le dissoudre dans un milieu nutritif (l'eau, de levure). Dans ces conditions ils obtinrent une fermentation du galactose pur.

Ce dernier travail eut le mérite de ramener les chercheurs dans la bonne voie, celle qu'avait suivie Pasteur, c'est-à-dire dans l'emploi de milieux nutritifs.

M. Fischer, à la suite de ses études sur la synthèse des sucres, en collaboration avec M. H. Thierfelder, étudia l'action de diverses espèces de levures provenant du laboratoire de

1. La levure employée par M. Bourquelot était une levure que livre journellement le commerce.

M. Hansen. Opérant avec des levures pures ensemencées dans des solutions nutritives contenant du galactose pur, leurs conclusions furent à l'abri des critiques précédentes. Ils constatèrent que certaines levures attaquaient le galactose tandis que d'autres, dans les mêmes conditions, laissaient ce sucre intact. En même temps ils ne purent trouver, d'après leur action sur le galactose, de différence entre les levures hautes et les levures basses. Ce dernier résultat fut contredit par M. Neumann Wender, mais de récentes expériences de M. Bau ainsi que les miennes confirment les conclusions de MM. Fischer et Thierfelder.

L'existence de levures ne faisant pas fermenter le galactose fut confirmée par les expériences de MM. Voit, Cremer et Bau.

A ce moment M. Voit émit une théorie sur laquelle je reviendrai brièvement dans la suite.

La découverte de la zymase alcoolique par M. Buchner amena mon attention sur la notion de fermentation par entraînement qui me semblait ne plus s'accorder avec la nouvelle découverte. Si elle s'accordait, c'est qu'un phénomène très intéressant se produisait et c'est pour le faire ressortir que je me suis livré à cette étude.

Un travail récent de M. Dubourg, paru pendant le cours de ces recherches, a déjà jeté un certain jour sur l'action des levures inactives vis-à-vis du galactose. En étudiant la fermentation des saccharides au moyen de levures reconnues comme inactives vis-à-vis de ceux-ci, ce savant découvrit qu'il suffisait d'employer un milieu riche en azote et d'ajouter au saccharide considéré un peu de glucose pour obtenir la fermentation des deux sucres. Ces résultats sont également vrais quand on remplace le saccharide par le galactose.

Dans le cours de ce travail, en même temps que je montrerai la relation étroite qui unit les levures actives et inactives vis-à-vis du galactose, je ferai voir les changements importants qui surviennent dans l'intérieur d'une cellule à la suite du remplacement d'un hydrate de carbone par un autre, le galactose, de constitution très voisine.

I

TECHNIQUE

Préparation du galactose pur. — La première condition pour commencer notre étude, c'est d'avoir du galactose pur. On le trouve dans le commerce sous le nom de galactose pur, mélangé à 10 0/0 de glucose. C'est ce dernier sucre qu'il faut éliminer. M. Bourquelot avait fait cristalliser ce sucre dans l'alcool. Le glucose est soluble, le galactose l'est très peu.

Sa méthode était longue et même quelquefois incertaine. J'ai jugé préférable d'employer un autre procédé déjà signalé par M. Bau qui consiste à dissoudre le galactose dans un milieu nutritif et à ensemencer dans ce milieu une levure inactive vis-à-vis du galactose. Comme milieu nutritif j'employai l'eau de touraillons et je remplaçai le *Saccharomyces apiculatus* de M. Bau par le *S. Ludwigii* dont l'activité était plus grande. Cette levure consomme tout le glucose et laisse inattaqué le galactose. La fermentation finie, on évapore le liquide de façon à le concentrer, on traite le liquide au noir aminimal pour le décolorer en partie et on reprend par l'alcool bouillant. Par refroidissement le galactose cristallise. Une deuxième cristallisation est nécessaire.

J'ai vérifié ce procédé de purification de manière à voir si seul le glucose était attaqué.

J'ai fait pour cela des mélanges de galactose purifié d'après la méthode de M. Bourquelot, c'est-à-dire au moyen de l'alcool, avec du glucose pur. Je dissous ces mélanges dans l'eau de touraillons pure, ou additionnée de 1 0/0 de peptone ou de 1 0/0 de phosphate d'ammoniaque. J'ensemence ces milieux au moyen du *S. Ludwigii*. Le dégagement gazeux terminé, je dose le sucre restant au moyen de la liqueur de Fehling. Quelque soit le milieu, j'ai obtenu des résultats semblables dont voici quelques exemples :

Sucre introduit en milligr.		Sucre restant en milligr..
Glucose.	Galactose.	Galactose.
203	94	98
452	142	140
104	188	186

Ces quelques chiffres suffisent pour montrer que le glucose seul

a disparu et qu'on retrouve inattaqué tout le galactose introduit.

Cette méthode de purification du galactose en dissolution dans l'eau de touraillons était rapide surtout lorsqu'on voulait obtenir une solution de galactose pur dans ce milieu nutritif. Il suffisait d'évaporer au bain-marie le liquide et de reprendre par l'eau l'extrait débarrassé de l'alcool et d'une grande partie de sa glycérine.

Pour obtenir le galactose pur et cristallisé plus rapidement, j'ai modifié cette méthode.

Je cultive le *Saccharomyces Ludwigii* dans l'eau de touraillons additionnée de 1 0/0 de glucose. La levure se développe et fait rapidement disparaître le sucre. On soutire alors le liquide fermenté qu'on remplace par une solution stérilisée de galactose dans l'eau distillée : la levure n'ayant pas été enlevée par le soutirage. Nous verrons à la fin de ce chapitre la méthode suivie pour soutirer aseptiquement le liquide de fermentation.

L'impureté principale, le glucose, disparaît très vite sous l'action de la levure. Le galactose reste mélangé à un peu d'impuretés provenant de la levure. On évapore alors le liquide filtré en partie et on fait cristalliser le galactose. Cette première cristallisation reprise par l'alcool concentré et chaud donne par le refroidissement un galactose très pur dont le pouvoir rotatoire est :

$$(\alpha)_D = 80^{\circ} 71.$$

Par ce procédé on est toujours certain d'opérer avec du galactose exempt de glucose.

Procédés de dosage. — Avant d'aborder l'étude de la fermentation du galactose, je dois indiquer les procédés de dosage que j'ai employés.

J'ai dû effectuer un assez grand nombre de dosages de sucre. J'ai opéré à l'aide de la liqueur de Fehling préparée d'après la formule de Pasteur. J'amenais les liquides à analyser à une teneur de 1 0/0 de sucre. Je notais la quantité de liquide sucré nécessaire pour décolorer 5 c. c. de liqueur de Fehling. Souvent je ne disposais pas d'une quantité suffisante de liquide sucré pour faire un dosage au saccharimètre.

Dosage d'un mélange de deux sucres. — Dans plusieurs expériences j'ai mélangé le galactose ou le lactose au glucose, ou au lévulose, ou enfin au saccharose. Comme la différence entre le

pouvoir rotatoire du glucose et celui du galactose est peu considérable, j'ai dû renoncer à l'emploi du saccharimètre, de faibles erreurs dans la lecture pouvant entraîner des inexactitudes dans le dosage.

J'ai employé un procédé un peu plus long, mais qui m'a permis d'éviter de trop grandes erreurs.

On prélève d'abord une certaine quantité de liquide sucré et on y dose le sucre total au moyen de la liqueur de Fehling.

La seconde portion de ce liquide sucré est stérilisée, additionnée au besoin d'eau de touraillons etensemencée avec le *S. Ludwigii*.

La fermentation finie, on détermine le sucre restant par un nouveau titrage à la liqueur cupropotassique qui donne le galactose restant. Connaissant la quantité totale de sucre et la quantité de galactose restant, il est facile d'obtenir la proportion de sucre mélangé au galactose.

Quand dans le mélange de sucre se trouve du lactose, on remplace le *S. Ludwigii* par une levure de bière très active qui laisse intact ce dernier sucre.

Il m'est arrivé de rechercher la proportion de deux sucres dissous dans un liquide renfermant un antiseptique. J'ai alors modifié un peu la méthode. On commence par cultiver le *S. Ludwigii* dans l'eau de touraillons additionnée de 2 0/0 de glucose. La fermentation finie, on sépare la levure du liquide fermenté en opérant comme nous allons bientôt l'indiquer. On porte alors la levure développée dans le mélange des deux sucres préalablement stérilisés et dilués de façon à diminuer l'influence de l'antiseptique. Après la fermentation, il ne reste plus que du galactose.

J'ajouterai que cette méthode a été préalablement expérimentée et les résultats nous ont démontré l'exactitude des nombres à 1/50 près.

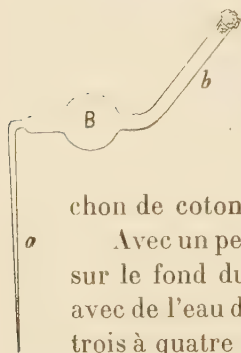
Dosage de CO² dégagé. — Dans certaines expériences j'ai été obligé de doser directement la quantité de sucre fermenté en analysant la quantité de CO² dégagé pendant la fermentation. Dans des ballons d'un volume assez grand, de façon à ne pas avoir intérieurement une pression de plus de 3 atmosphères, la fermentation terminée j'introduisais le liquide à fermenter. Après stérilisation j'ensemenciais, je faisais le vide dans le ballon au moyen de la trompe à eau.

Il restait encore un ou deux centimètres cubes d'air qui suffisaient pour favoriser le développement de la levure. Je fermait les ballons à la lampe et, la fermentation terminée, j'extrayais le gaz au moyen d'une trompe à mercure. Je dosais CO_2 récolté sur le mercure. La quantité de gaz trouvée était transformée d'après la formule.



en glucose disparu.

Technique employée pour récolter d'une manière aseptique une certaine quantité de levure pure. — Le procédé simple que j'ai employé était le suivant. Je cultive les levures dans des ballons ordinaires (matras Bohème). Le sucre disparu, je soutire le liquide fermenté au moyen d'un siphon de 3^m de diamètre préalablement fermé à la lampe et flambé à 180°.



Afin d'éviter l'introduction des poussières par suite de l'aspiration d'air que produit le siphonnement, le siphon était maintenu contre le col du ballon au moyen du bou-

chon de coton.

Avec un peu d'habitude, la levure reste en grande partie sur le fond du ballon. On la lave alors une première fois avec de l'eau distillée stérile et on la laisse se déposer pendant trois à quatre heures dans un lieu frais. La levure une fois déposée, on soutire le premier liquide de lavage et on le remplace par de l'eau distillée également stérile. On agite bien le ballon de façon à mettre la levure en suspension qu'on enlève ensuite immédiatement du ballon. Un instrument commode pour faire cet enlèvement est une pipette flambée à 170° de la forme indiquée sur la figure. Elle se compose d'une boule B, terminée par deux tubes recourbés *a* et *b*. Le tube *a* a 3 millimètres de diamètre; comme le siphon, il est fermé à la lampe. Le tube *b* a 7 millimètres de diamètre et est bouché par un tampon de coton. C'est de ce côté qu'aura lieu l'aspiration. Le tube *a* plonge dans le ballon. Sa pointe a été cassée et flambée avant d'être introduite dans le ballon. On aspire par *b*; le liquide et la levure arrivent dans la boule B.

On enlève la pipette du ballon et la levure est portée dans un

tube à essai vide préalablement stérilisé. Celle-ci se dépose au fond du tube et, 12 heures après, le liquide surnageant est enlevé au moyen d'un siphon. La levure ainsi déposée au fond d'un tube sera désignée par abréviation, dans le cours de ce travail, sous le nom de *levure en masse*.

L'ensemble des deux lavages ne doit pas durer plus de 24 heures, sinon les cellules vieillissent, leur intérieur devient granuleux et les expériences ne sont plus comparables.

Toutes les fois que j'ai eu besoin d'une certaine quantité de levure pure, je me suis servi de ce procédé.

II

FERMENTATION DU GLUCOSE ET DU GALACTOSE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX

Précédemment j'ai indiqué que MM. Fischer et H. Thierfelder avaient découvert certaines levures n'attaquant pas le galactose. Dans ce chapitre je comparerai l'action d'une même levure se développant dans le même milieu nutritif azoté, mais sucré soit avec du glucose, soit avec du galactose ; je laisserai donc de côté ces levures inactives vis-à-vis du galactose ; et toutes les levures que j'aiensemencées dans les expériences suivantes décomposent le galactose comme le glucose en alcool et en acide carbonique.

Je signalerai en passant la fréquence avec laquelle on rencontre ces levures inactives vis-à-vis du galactose. Aussi, en ensemençant 89 espèces de levures de la collection du laboratoire dans l'eau de touraillons additionnée de 1 0/0 de peptone et de 4 0.0 de galactose pur du commerce, c'est-à-dire dans d'excellentes conditions de nutrition, nous en avons trouvé 23 0/0 qui ne purent faire fermenter le galactose. Cette proportion est à peu près le $\frac{1}{5}$, c'est-à-dire une proportion assez élevée.

Fermentation du galactose et du glucose dans différents milieux.

— Contrairement à une opinion reçue dans la science, il ne faudrait pas croire que les levures aient besoin, comme milieu nutritif, d'un aliment complexe comme l'eau de levure. Certains milieux minéraux tels que le liquide Laurent ou le liquide Raulin

additionnés de galactose, ensemencés avec certaines levures, permettent d'obtenir de l'alcool, dont la proportion peut atteindre 6 %.

Cette proportion d'alcool peut être dépassée si on change le milieu nutritif ou si on y ajoute de la peptone ou du phosphate d'ammoniaque, par exemple. L'effet de ces substances sur la fermentation varie-t-il avec le sucre dissous dans le milieu nutritif ?

Tel est le problème que je me suis posé. Pour cela j'ensemence une levure dans les trois milieux nutritifs suivants :

Eau de touraillons additionnée de 20 % de galactose ou 30 % de glucose.
 Eau de touraillons + 2 % peptone addit. — — —
 Eau de touraillons + 2 % phosphate d' AzH_3 . — — —

Pour deux levures j'ai obtenu les résultats suivants :

Milieu de culture.		Alcool en vol. %/o. Poids de lev. milligr	
Levure Bass.		—	—
Eau de touraillons	+ glucose	44,12	48
—	+ galactose	3,30	50
—	+ peptone + glucose	16,60	48
—	+ — + galactose	5,00	52
—	+ phosph. AzH_3 , glucose	12,37	49
—	+ — + galactose	3,40	51
Levure de Froberg.			
1) E. de t.	+ glucose	7,28	35
2) E. de t.	+ galactose	5,00	31
3) E. de t. pept.	+ glucose	9,12	39
4) E. de t. —	+ galactose	7,00	40
5) E. de t. phosph.	+ glucose	8,12	50
6) E. de t. —	+ galactose	5,25	51

L'examen de ces chiffres montre déjà que la quantité maximum d'alcool fourni par la levure augmente quand on ajoute de la peptone ou du phosphate d'ammoniaque. L'augmentation a lieu quel que soit le sucre employé.

Mais ces résultats mis sous une autre forme feront mieux voir la non-influence du sucre. Faisons en effet pour un milieu donné le rapport $\frac{\text{alcool du milieu glucosé}}{\text{alcool du milieu galactosé}}$ nous trouvons :

RAPPORT $\frac{\text{alcool milieu nutritif renfermant du glucose.}}{\text{alcool milieu nutritif renfermant du galactose.}}$

Milieu de culture	Levure Bass.	Levure Froberg.
Eau de Touraillons	3,34	1,45
— — + peptone	3,32	1,30
— — + phosphate	3,62	1,54

Pour chaque levure, le rapport ainsi formé est à peu près constant, ce qui revient à dire que l'addition de peptone ou de phosphate augmente la proportion de glucose décomposé par la levure ainsi que celle du galactose dans un même rapport.

En passant, nous constatons que l'azote augmente la quantité d'alcool produite, c'est-à-dire diminue l'influence nocive de ce corps. Cette remarque a été utilisée par M. Dubourg pour rendre actives des levures inactives.

Influence des acides sur la fermentation du galactose et du glucose.

— Nous connaissons depuis longtemps l'influence des acides sur les levures. M. Duclaux a basé sur elle une méthode de différenciation des espèces de levures.

J'ai voulu examiner le cas de l'action des acides sur la fermentation du galactose. Je ne citerai pour exemple que le cas de l'acide tartrique, les autres acides se comportant comme celui-ci, en employant une dose convenable.

Rajeunissons nos levures dans des matras Pasteur contenant de l'eau de touraillons additionnée soit de glucose, soit de galactose. Les levures rajeunies sontensemencées dans des tubes contenant des doses variables d'acide tartrique, 0,5 0/0, 1 0/0, 1,5 0/0, etc., et 4 0/0 de sucre qui était pour les uns du glucose, pour les autres du galactose.

Si on examine les tubes contenant du glucose, on voit que la levure s'y développe, quelle que soit l'origine de la semence, mais il n'en est pas de même des tubes contenant du galactose. On constate que les levures rajeunies préalablement en présence de galactose supportent dans ces conditions des doses d'acides plus fortes que celles rajeunies seulement en présence du glucose. Ainsi 2 0/0 d'acide arrêtaient ou empêchaient la fermentation du galactose avec ces dernières levures et non avec les premières.

Nous constatons l'influence de l'origine de la semence; et sur ce sujet nous aurons l'occasion de nous étendre.

Je passe sous silence comme n'offrant qu'un très faible intérêt les analyses relatives à une fermentation de galactose pur dissous dans un milieu nutritif. Les produits qu'on retire sont ceux d'une fermentation alcoolique ordinaire, alcool, acide carbonique, glycérine, acide succinique dans des proportions à peu près identiques à ce qu'ils seraient pour une fermentation de glucose.

L'activité de la fermentation du galactose est moindre que

celle du glucose, et un acide peut empêcher la fermentation du galactose sans influencer sur celle du glucose. Voici ce que nous venons de voir.

Nous avons encore vu que dans certains cas l'origine de la levure avait une influence. Peut-on distinguer cette influence au microscope?

Au microscope il est impossible de constater une différence dans la forme des cellules. Donc, au point de vue morphologique, aucune différence.

Si on écrase sous la lamelle du microscope une levure, en appuyant au moyen d'un agitateur qu'on déplace, on constate que les cellules se rompent plus ou moins facilement. Les cellules rondes se déchirent plus facilement que les cellules allongées, et les grandes mieux que les petites. Mais l'âge ainsi que l'accoutumance à un sucre (glucose ou galactose) ne facilitent ni ne retardent cet écrasement des cellules.

Si donc la culture d'une levure sur un milieu nutritif additionné de galactose diffère de la culture de la même levure sur un milieu nutritif additionné de glucose, ce sera aux propriétés physiologiques de la cellule et non aux propriétés morphologiques que nous devons nous adresser.

III

ACCOUTUMANCE DES LEVURES AU GALACTOSE

Nous venons dans le chapitre précédent de reconnaître l'influence possible de l'origine de la semence sur la décomposition du galactose en alcool et en acide carbonique.

D'autres expériences nous permettent de constater le même fait. Je citerai par exemple celle-ci : J'ensemence dans du liquide Laurent additionné de 0,5 0/0 de peptone et de 4 0/0 de galactose une levure depuis 1 mois développée dans un matras Pasteur. Si ce dernier avait renfermé préalablement du glucose, la levure ne se développe pas dans le liquide Laurent. Si au lieu de glucose le matras avait renfermé du galactose, la levure se développe très bien.

Avec une levure jeune, l'influence de l'origine de la semence est nulle.

Pour mieux nous rendre compte de cette influence qui se

manifeste dans des conditions spéciales, changeons notre manière d'opérer et plaçons la levure de façon à réduire au minimum sa multiplication pendant la durée de nos essais. Si une levure cultivée dans un même milieu mais en présence de différents sucres possède des propriétés différentes, celles-ci demeureront tant que les levures ne se multiplieront pas et il sera facile de les mettre en évidence.

Or, pour rendre minima la multiplication, nous avons opéré de la manière suivante :

Pasteur et ensuite Brown ont constaté qu'en introduisant des quantités croissantes de levures dans un milieu nutritif sucré il arrivait un moment où la levure introduite ne variait plus de poids pendant la fermentation. En augmentant encore la quantité de celle-ci, on obtenait une diminution dans le poids des cellules et, examinée au microscope, une telle levure bourgeonnait très peu. Si donc on force la dose de levure, on réduit sa multiplication en la rendant sensiblement nulle. Je me suis placé dans ces conditions en opérant de la manière suivante : Dans 100 c. c. d'un milieu nutritif donné on cultive une levure pure. En employant le procédé décrit au chapitre I on décante la levure et on la place dans des tubes. On obtient de cette façon dans chaque tube de 0^{gr},100 à 0^{gr},130 de *levure en masse*. En faisant agir cette levure en masse sur 5 c. c. d'une solution de glucose ou de galactose, nous faisons une fermentation avec 20 fois plus de levure qu'il ne s'en serait développé si on avaitensemencé ce volume de liquide avec une trace de levure. Je suis donc dans le cas indiqué plus haut. J'appellerai pour abrégér *levure habituée à un sucre donné*, une levure obtenue en la cultivant dans l'eau de touraillons additionnée du sucre considéré.

Expérience I. — Prenons un certain nombre de tubes renfermant de la levure en masse habituée soit au glucose soit au galactose. Dans chacun j'introduis 5 c. c. d'une solution de galactose à 60/0. On les place à l'étuve à 25° et on note le moment où on peut compter 1 bulle gazeuse par seconde. Ce moment est considéré comme le commencement de la fermentation. Tous les tubes renfermant la levure habituée au galactose fermentent au bout de 2 heures. Ceux qui renferment la levure habituée au glucose restent pendant 24 heures et souvent plus longtemps sans

manifeste la moindre fermentation. Je laisse de côté en ce moment les levures de lactose sur lesquelles nous allons bientôt revenir. La même expérience répétée en remplaçant la solution de galactose par 5 c. c. d'une solution de glucose ne permet pas de différencier les levures accoutumées ou non au galactose.

Donc en réduisant, comme nous le faisons, la multiplication, nous constatons une très grande différence entre le moment où la fermentation du galactose commence dans les tubes renfermant des levures habituées à ce sucre et dans ceux renfermant des levures habituées au glucose. Une fois la fermentation du galactose commencée par ces dernières, elle marche aussi vite qu'avec les levures habituées au galactose. Il faut donc penser qu'un travail intérieur a dû se faire pendant la période d'inactivité de la levure. Sur la nature de ce travail nous ne pouvons nous étendre pour le moment.

Nous constatons et retenons pour l'instant que naturellement les levures sont accoutumées au glucose, tandis qu'elles ne le sont pas au galactose, sucre plus rare ou mieux moins répandu à l'état libre. Je dis moins répandu à l'état libre, car de nombreuses expériences, entre autres les récentes recherches de M. G. Bertrand, nous apprennent que chez les plantes on trouve du galactane qui par hydrolyse donne du galactose.

Nous avons rejeté pour le moment les levures de lactose. C'est que celles-ci, habituées au glucose, manifestent une certaine habitude au galactose. Ainsi au bout de 2 heures, chez certaines de ces levures habituées au glucose, on obtient un commencement de fermentation du galactose, mais il faut ajouter qu'habituées au galactose ou au lactose ces levures manifestent une activité vis-à-vis du galactose presque inconnue chez les autres. Voici en effet quelques nombres.

Levure lactose.	Origine.	La fermentation commence après
	Saccharose.	24 heures.
DUCLAUX.	Galactose.	1 heure.
KAYSER.	Saccharose.	2 heures.
	Galactose.	1 heure.
	Lactose.	30 minutes.

L'acclimation est donc encore ici manifeste. Elle est plus sensible encore quand on habitue les levures au lactose.

Expérience II. — Les résultats de la première expérience se rapportent à des levures habituées au glucose ou au galactose.

Voyons l'action des autres sucres (levulose, saccharose, maltose, mélibiose, lactose).

Dans des tubes renfermant une *levure en masse* habituée à l'un ou l'autre de ces sucres, nous introduisons 5 c. c. d'une solution de galactose. Si nous désignons par *Tm* le temps mort pendant lequel toute fermentation semble nulle dans les tubes, nous obtenons les résultats suivants avec deux levures :

	Origine.	T. m
Levure de lactose.	Saccharose.	2 heures.
	Galactose.	1 heure.
	Lactose.	1/2 heure.
	Maltose.	2 heures.
	Glucose.	2 jours.
Levure de Froberg.	Saccharose.	2 jours.
	Levulose.	2 } jours.
	Mélibiose.	1 heure.
	Galactose.	1 heure.

Le saccharose, le glucose, le levulose, le maltose, c'est-à-dire tous les sucres qui ne peuvent par hydrolyse donner du galactose donnent des levures qui manifestent un temps mort considérable quand *en masse* on les met en présence de galactose. Au contraire le lactose et le mélibiose, sucres qui, sous l'action des acides ou de diastases, la lactase ou la mélibiase, donnent du glucose et du galactose, sont les seuls avec le galactose capables d'acclimater les levures à ce sucre.

Les mêmes levures habituées à ces différents sucres, mais qui reçoivent du glucose en place de galactose, ne manifestent aucun temps mort comme précédemment avec le galactose, l'activité étant sensiblement la même quel que soit le sucre auquel la levure tire son origine.

Je dis sensiblement la même, car si on prend une levure habituée au glucose et au levulose par exemple, et qu'on la fasse agir sur une solution de glucose, on constate chez la première une activité légèrement supérieure. Avec ces mêmes levures mais mises en présence d'une solution de levulose, l'ordre est inverse, cependant ces différences sont si faibles que dans notre travail nous les négligerons.

En résumé, toute levure faisant fermenter le galactose a dû s'habituer préalablement à ce sucre. Cette condition n'est pas nécessaire pour le glucose. Cette différence est très importante.

Expérience III. — De façon à bien montrer les conditions

nécessaires pour constater cette différence entre les levures habituées au galactose et celles qui ne le sont pas, modifions un peu le dispositif de l'expérience I. Prenons trois ballons aplatis comme l'indique la figure.



En *a* est un tube fermé à sa partie inférieure.

Dans chacun de ces ballons nous introduisons 400 c. c. d'eau de touraillons additionnée dans l'un de glucose, dans un second de maltose et dans le troisième de galactose. On ensemece et, une fois la levure développée, on soutire le liquide en faisant en sorte que la levure reste au fond du ballon. Celle-ci est lavée et on s'arrange de façon que toute la levure reste dans le petit tube *a*. L'eau de lavage est remplacée par une solution de galactose. 24 heures après, on analyse chaque ballon et on trouve :

		Sucre fermenté %
Ballon renfermant eau de touraillons	glucose.....	3,80
— — —	maltose.....	3,70
— — —	galactose.....	4,02

La levure en masse a pu se multiplier sur le fond du ballon et a permis aux cellules de s'accoutumer rapidement au galactose au point de rendre nulle l'influence de leur origine.

Rapport entre l'activité de la fermentation du glucose et celle du galactose. — Si on fait agir une levure habituée au galactose sur une solution de glucose ou une solution de galactose, on constate qu'il existe un rapport entre la quantité de glucose décomposé et la quantité de galactose fermenté par un poids donné de levure au bout de 24 heures.

Également pour abréger nous désignerons ce rapport par *R*.

Voici quelques valeurs trouvées pour *R* avec différentes levures.

Levure	Poids de levure en milligr.	Valeur de <i>R</i> .
—	—	—
Levure Bass.	108	1,6
Levure distillerie Alfort	91	1,65
Levure de vin N° 6	85	1,5

Pour toutes ces levures on voit que les valeurs de *R* sont sensiblement constantes. J'ai trouvé des résultats semblables pour d'autres levures. Ceci signifie que chez les levures habi-

tuées au galactose ce sucre fermente 1,6 fois moins vite que le glucose. Chez les levures habituées au glucose la valeur de R au bout de 24 heures est généralement égale à ∞ . A mesure que la levure s'acclimata, ce rapport diminue.

MM. Buchner et Rapp, opérant avec la zymase alcoolique qu'ils retirèrent de levures non acclimatées, ont trouvé les quantités suivantes de CO_2 dégagé en présence de 1 0/0 de toluène.

Sucre.	Concentration.	Co ² dégagé après		
		16 heures.	24 heures.	40 heures.
Glucose	3‰	0,40	0,61	0,70
Galactose	3‰	0,08	0,11	0,12
Valeur de R.		5	5,5	5,8

Les valeurs de R qu'on tire des résultats de MM. Buchner et Rapp sont plus élevées que celles tirées de nos expériences.

Cette valeur de $R = 1,6$ nous sera utile dans un chapitre prochain pour nous rendre compte du degré d'accoutumance des levures au galactose. La valeur de R pour les levures de lactose habituées au glucose est égale à 4 ou 5 après 24 heures. Nous dirons que ces levures sont en partie accoutumées au galactose.

Durée de l'acclimation. — L'accoutumance une fois établie chez une cellule persiste-t-elle et dans quelles conditions persiste-t-elle?

Ce problème posé, pour le résoudre on peut prendre une série de tubes renfermant de la *levure en masse* habituée soit au glucose soit au galactose. Je désignerai par des numéros impairs 1 et 3 les tubes renfermant les levures habituées au premier sucre et par des numéros pairs 2 et 4 ceux renfermant les levures habituées au galactose.

Ceci fait, j'ajoute 4 c. c. d'une solution de glucose à 31 0/0 dans les tubes 1 et 2 et 4 c. c. d'une solution de galactose à 10,91 0/0 dans les tubes 3 et 4.

Le temps mort est de 1 heure dans les tubes 1, 2 et 4, il est de 24 heures dans le tube 3.

Au bout de 5 jours la fermentation est terminée, sauf dans le tube 3 où tout dégagement gazeux cesse seulement au bout de 10 jours. Aussitôt la fermentation achevée dans un tube, on soutire le liquide fermenté, on lave la levure à l'eau distillée et on y introduit une nouvelle solution sucrée.

Les tubes 1, 2 et 3 reçoivent deux c. c. d'une solution de galactose à 7,09 0/0 et le tube 4 deux c. c. d'une solution de glucose à 10 0/0.

Une heure après l'introduction du liquide sucré, le dégagement gazeux commence dans les tubes 3 et 4 et seulement au bout de 4 heures dans le tube 2. La levure du tube 3 s'est donc accoutumée au galactose, celle du tube 2 a conservé une partie de ses anciennes propriétés malgré la porportion assez grande de glucose que cette levure a dû décomposer. Son accoutumance n'a donc pas disparu.

La levure du tube 1 épuisée par une première fermentation de glucose, renfermant un protoplasma vieilli, n'a cependant pas perdu la propriété de s'habituer au galactose. Elle y met beaucoup plus de temps que précédemment la levure du tube 3. Son temps mort est de 4 jours au lieu de 24 heures, mais ce temps est sans importance, cette levure s'accoutume encore.

L'exemple que je viens de rapporter est relatif à une levure qui s'acclimate assez facilement.

Je résume dans un tableau synoptique l'exemple d'une autre levure (une levure de bière haute : la levure Bass) qui compte parmi les plus longues à s'acclimater.

Tube 1.	Tube 2.	Tube 3.	Tube 4.
reçoivent 4 c. c. solution de glucose.		reçoivent 4 c. c. solution de galactose.	
La fermentation commence après			
2 heures.	2 heures.	48 heures.	2 heures.
Tout dégagement gazeux cesse après			
5 jours.	5 jours.	10 jours.	5 jours.
On ajoute après la fin du dégagement gazeux du			
galactose.	galactose.	galactose.	glucose.
La fermentation commence après			
5 jours.	12 heures.	1 heure.	1 heure.

On ajoute du galactose dans le tube 4, la fermentation commence au bout de 12 heures.

Ces deux exemples nous montrent donc que lorsqu'une levure accoutumée au galactose fait fermenter du glucose, elle perd en partie son acclimation. Mais dans le cas de levure en masse, cette perte n'est que partielle. Avec la levure Bass, où

cette perte est maximum, une levure ainsi traitée se rappelle encore très bien son acclimatation primitive.

Cette propriété est donc d'une stabilité relative, mais il reste acquis, pour que l'accoutumance reste maximum, que la présence du galactose est nécessaire. C'est ce qui arrive également chez les animaux dont l'organisme immunisé contre une toxine perd de son immunité dès que la toxine cesse d'agir jusqu'à devenir nulle au bout d'un temps plus ou moins long.

Expérience IV. — Complétons l'expérience précédente, mais au lieu de faire agir la *levure en masse* sur une solution de sucre fermentescible par elle, faisons-la macérer dans l'eau distillée ou en présence d'un sucre non fermentescible par elle comme le lactose. Au bout de 8 jours on introduit sur cette levure une solution de galactose. Si celle-ci, avait été préalablement acclimatée au galactose, la fermentation commence rapidement mais cesse bientôt, l'alcool produit devenant nuisible.

Une levure habituée au glucose s'acclimate très bien au galactose après cette macération et est même moins sensible à l'influence de l'alcool que précédemment la levure habituée au galactose.

De cette expérience nous retenons ce fait qu'une levure acclimatée, restant dans l'eau sans addition de sucre, conserve la propriété d'attaquer au bout de 1 ou 2 heures le galactose qu'on lui fournit. Quant à l'action funeste de l'alcool, elle peut tenir à des causes très variées sur la nature desquelles nous ne pouvons entrer.

Il faut donc, pour que la levure perde son accoutumance, qu'on lui fournisse un sucre fermentescible autre que le galactose.

En résumé, nous venons de voir et de démontrer qu'une levure dont le développement s'était effectué en l'absence de galactose éprouve pendant un certain temps une sorte de répulsion pour ce sucre avant de l'attaquer. Nous désignerons ce temps sous le nom de *période d'accoutumance*.

Une fois habituée au galactose, la levure possède la propriété de décomposer le glucose 1,6 fois plus vite que le galactose.

Cette accoutumance peut disparaître en partie perdue quand un autre sucre est donné à fermenter à la levure; mais, en laissant simplement la levure macérer dans l'eau, elle ne perd pas la faculté d'attaquer rapidement le galactose: si elle est accou-

tumée, elle devient seulement plus sensible à l'action de l'alcool.

IV

INFLUENCE DE CERTAINES SUBSTANCES SUR L'ACCOUTUMANCE ET LA FERMENTATION DU GALACTOSE

Maintenant que nous savons qu'une période d'accoutumance existe chez toutes les levures non habituées au galactose, étudions l'influence possible, même probable, de diverses substances qui peuvent favoriser ou retarder le moment où la levure devient capable d'attaquer ce sucre. Ces substances peuvent être indifférentes pendant la période d'accoutumance, mais agir sur la fermentation du galactose et l'entraver.

Avant d'entrer dans l'étude de l'action de ces substances, je signalerai certains corps ou même certains facteurs qui sont indifférents soit sur l'accoutumance, soit sur la fermentation du galactose.

Causes indifférentes. — Il demeure entendu qu'il n'existe aucune relation pouvant différencier les levures hautes des levures basses dans la durée d'acclimatation des levures au galactose. Cette durée est très variable, elle est de 3 heures pour une levure de lactose et de 72 heures pour certaines levures de bière.

Le milieu nutritif qui a servi au développement de la levure avant son introduction dans les tubes flambés est également indifférent. Ainsi je remplaçai l'eau de touraillons qui me servait comme milieu de culture par du liquide Raulin, du liquide Laurent, de l'eau de levure, des bouillons, etc., et les levures développées dans de tels milieux, mises en masses, se comportaient exactement de la même manière quand on les faisait agir sur une solution de galactose pur.

CAUSES QUI INFLUENT : Influence de l'air. — Ce n'est pas un facteur qui intervient d'une façon très sensible. Dans certaines conditions toutes spéciales on peut mettre son influence en évidence. Nous avons vu qu'une levure de lactose habituée au glucose pouvait attaquer le galactose au bout de 2 heures. Or, une condition est nécessaire pour obtenir ce résultat, c'est que la levure ait à sa disposition une certaine quantité d'oxygène. Si

on remplace nos matras de Bohême qui nous ont servi comme ballons de culture par un ballon permettant de faire une culture en profondeur, on constate que la durée d'accoutumance a considérablement augmenté et atteint 8 et même 12 heures. En diminuant l'arrivée de l'air, on retarde l'acclimatation. Pour les autres levures, l'air semble être indifférent.

Influence de la concentration du sucre. — Dans les expériences rapportées précédemment, j'ai toujours fait développer mes levures dans des milieux contenant 2 0/0 de sucre. Cette concentration avait été choisie de telle sorte que la levure, au bout de 3 jours, ait fait disparaître tout le sucre. On eût pu, dans la majorité de nos expériences, opérer avec une concentration moitié moindre, excepté dans l'expérience suivante.

Si nous ensemençons une levure de lactose dans des liquides dont la concentration du sucre aille en décroissant, on constate que cette levure mise en masse en présence de galactose s'acclimata plus ou moins rapidement selon la concentration du liquide originel. Ainsi, en opérant avec de l'eau de touraillons renfermant 2 0/0, 1 0/0 et 0,5 0/0 de glucose, nous avons obtenu les résultats suivants :

Concentration du glucose.	Durée d'accoutumance.
2 0/0	3 heures.
1 0/0	8 heures.
0,5 0/0	36 heures.

Plus il y avait de sucre originellement, plus la durée d'accoutumance est courte. Certaines levures de lactose qui semblaient faire un groupe à part, à cause de leur courte durée d'accoutumance rentrent dans la catégorie des autres levures quand on diminue la concentration du sucre du milieu de culture.

Avant de passer à l'étude des substances qui influent soit sur l'accoutumance des levures au galactose, soit sur la fermentation de ce sucre, il faut ouvrir une parenthèse nécessaire pour expliquer les modifications techniques qu'il a fallu apporter dans le but d'éviter de grossières erreurs.

Absorption du galactose par les levures. — Si on prend une levure en masse habituée seulement au glucose, par exemple, et qu'après l'avoir fait agir 12 heures sur une solution de galactose on dose le sucre restant (tout dégagement gazeux n'ayant pas

eu lieu) on constate une disparition de sucre non accompagnée de gaz carbonique.

Voici en effet quelques résultats :

Levures.	Concentration du galactose.	Sucre restant.	Poids levure milligr.
Levure de vin N° 6.	6 ‰	5,29	250
Levure de bière Bass.	6 ‰	5,00	209
Distillerie Alfort.	6 ‰	5,09	290

Avec les levures inactives vis-à-vis du galactose, on trouve des résultats identiques :

S. Ludwigi.	6 ‰	5,20	540
S. Apiculatus.	6 ‰	5,20	360

Cette propriété semble spéciale au galactose. Avec les levures ne sécrétant pas de maltase ou de lactase, le maltose et le lactose introduit à la place de galactose se retrouve intégralement dans les conduions de l'expérience précédente.

Il n'est pas nécessaire d'employer des levures pour constater cela. En diffusant simplement avec des dialyseurs ordinaires une solution contenant soit du galactose pur, soit un mélange de glucose et de galactose, on constate encore une absorption de galactose. La membrane dialysante était en parchemin animal. En analysant au bout de 4 heures les différentes proportions de galactose et de glucose dialysé nous avons trouvé les résultats suivants :

Sucre introduit en milligr.		Sucre dialysé en milligr.		Sucre non dialysé - en milligr.		Diffé-ence en milligr.
glucose.	galactose.	glucose.	galactose.	glucose.	galactose.	galactose.
154	0	68	0	86	0	0
102	48	45	15	57	27	8
51	97	22	31	28	54	16
0	145	0	45	0	77	25

La quantité de sucre manquant représente du galactose et celle-ci croit proportionnellement à la concentration du sucre.

Pour désigner cette disparition de galactose, nous dirons que le galactose a été absorbé par la levure.

Cette absorption de galactose doit être consécutive d'une diffusion, car il suffit de tuer les levures en les portant à 100° pour empêcher ce fait de se produire.

Ces phénomènes d'absorption ont été déjà signalés par Graham, je ne les mentionne que pour expliquer les modifications que j'ai dû apporter aux procédés d'analyse. Une fois la levure acclimatée, le galactose absorbé disparaît.

Si nous nous étions contentés de doser ce galactose restant après l'action d'une levure en présence d'un antiseptique, par exemple, nous aurions pu faire de grossières erreurs dues à l'absorption de galactose qui aurait été compté comme sucre disparu par la fermentation. Nous nous sommes mis à l'abri de cette erreur en dosant l'acide carbonique résultant de la fermentation.

Substances empêchant toute accoutumance. — J'ai apporté à la technique suivie jusqu'ici quelques modifications que je vais indiquer. Biernacki, dans ses études classiques sur l'action des antiseptiques, a montré que ces corps agissent et selon leur poids et d'après leur concentration. Elle dépend en outre de la quantité de levure employée.

Il fallait donc trouver un moyen de sécher une levure tout en la conservant pure, et de la peser également sans l'infecter.

Dans un tube à essai assez large et préalablement flambé, j'introduis de l'acide sulfurique pur. D'autre part je prends un petit tube contenant de la *levure en masse* et pure. Ce tube flambé extérieurement est introduit rapidement dans le tube plus large contenant SO_4H^2 aussitôt qu'un aide a retiré le bouchon de ce petit tube de façon à accélérer la dessiccation de la levure. Les deux tubes encastrés l'un dans l'autre avaient l'aspect que représente la figure ci-contre. Les tubes ainsi préparés sont placés sous la cloche à vide à la température de 25° . Le temps de séchage dure 4 à 6 jours suivant la levure. Celle-ci sèche, on retire le petit tube au moyen d'une pince. L'aide remet un bouchon flambé et on pèse le tube plein. Celui-ci avait été préalablement pesé vide, l'augmentation du poids représente le poids de la levure sèche.



Sur cette levure sèche on introduit 2 c. c. d'une solution de glucose ou de galactose avec l'antiseptique à étudier. On place ce petit tube dans un ballon à col assez long, on y fait le vide et

on ferme le ballon à la lampe. On dose l'acide carbonique dégagé.

Influence de l'acide borique. — On sait que l'acide borique agit d'une façon toute particulière sur la levure en facilitant son dépôt. Son action n'en est pas moins intéressante sur l'accoutumance des levures au galactose. Si on fait agir une *levure en masse* habituée au glucose sur une solution de galactosé additionnée de 0,66 0/0 d'acide borique, on ne constate aucun dégagement gazeux. La levure est dans l'impossibilité de s'acclimater à ce sucre. On obtient le même résultat si, au lieu d'employer une levure séchée, on employait une levure jeune.

Mais, à la place d'une solution de galactose, employons une solution de glucose. La fermentation se déclare aussi rapidement qu'en l'absence d'antiseptique. La dose d'acide borique employée n'était pas suffisante pour empêcher toute fermentation alcoolique du glucose, elle est largement suffisante pour ne pas permettre à une levure de s'accoutumer au galactose.

Pour bien montrer que l'acide borique n'agit pas en empêchant la fermentation du galactose, nous remplaçons notre levure habituée au glucose par la même espèce habituée cette fois au galactose. L'acide borique, dans cette expérience, agit sur la fermentation du galactose comme sur celle du glucose, en diminuant légèrement à cette dose l'activité de la fermentation.

Avec une levure accoutumée au galactose :

Le rapport $R = \frac{\text{Vitesse fermentative du glucose}}{\text{Vitesse fermentative du galactose}}$ est après 24 heures sensiblement égal encore à 1.6.

L'acide borique agit donc simplement sur la cellule non acclimatée, empêchant le travail interne d'accoutumance de se produire.

Pour toutes nos levures, l'acide borique s'est comporté de cette façon.

L'existence des levures inactives vis-à-vis du galactose tient, peut-être, à la présence dans leur intérieur d'une substance agissant à la manière de l'acide borique, et artificiellement avec cet antiseptique nous arrivons à faire passer, dans la catégorie des levures inactives, une levure réputée active vis-à-vis du galactose.

La présence de glucose n'empêche pas l'action de l'acide

borique sur l'accoutumance. En faisant fermenter un mélange de glucose et de galactose en présence d'acide borique avec de la *levure en masse* habituée au glucose ¹ on retrouve inattaqué le galactose introduit.

Si, au bout de 24 heures, le rapport $R = 1,6$, il ne faut pas croire qu'il en sera toujours ainsi si on note la durée du dégagement gazeux, on trouve les résultats suivants :

Sucre introduit 440 milligr.		Durée de la fermentation.	Poids levure milligr.
Levure acclimatée au galactose.	+ 2 c.c. glucose.	3 jours.	65
	+ 2 c.c. galactose.	6 jours.	82
	+ 2 c.c. glucose + 0 c. c. 02 B ₂ O ₃	5 jours.	65
	+ 2 c.c. galactose + 0,02	— 6 jours.	102
	+ 2 c.c. glucose + 0,04	— 4 jours.	73
	+ 2 c.c. galactose + 0,04	— 10 jours.	77

On peut remarquer la durée assez longue de la fermentation du galactose en présence de 0 c. c. 04, de B₂O₃. Ce résultat tient à l'influence de l'alcool combiné avec celle de ce corps.

En résumé, l'acide borique agit sur les levures non habituées au galactose et empêche toute accoutumance.

Son action sur la fermentation du galactose est comparable à celle sur la fermentation du glucose.

Influence du toluène. — Le toluène comme l'acide borique empêche l'accoutumance au galactose. Les levures de lactose habituées au glucose font exception à cette règle générale. En étudiant l'influence de l'acide borique, nous avons laissé de côté ces levures parce que leurs cellules sont très sensibles à l'action de ce corps aux doses que nous employions.

Les levures de lactose habituées au glucose sont en partie accoutumées naturellement au galactose, aussi s'explique-t-on la non-influence du toluène sur elles.

Le toluène possède le désavantage d'être peu soluble dans l'eau; nous avons été obligés, dans l'impossibilité de varier les doses, d'opérer dans des conditions telles que le liquide sucré en était saturé. Dans nos tubes renfermant les *levures en masse*, on ajoute le liquide sucré et une épaisseur de 1 cm. de toluène, de façon à maintenir l'eau saturée, ce corps étant assez volatil.

Aussitôt que l'antiseptique a disparu, les levures non accli-

1. Les levures habituées au levulose, maltose et saccharose se comportent comme les levures habituées au glucose.

matées s'accoutument au galactose, sauf dans quelques cas particuliers que nous rencontrerons plus loin.

Mais entre l'action du toluène et celle de l'acide borique existe une différence. Avec ce dernier, 100 mg. de levure font disparaître facilement 400 mg. de galactose dissous dans 2 c. c. de liquide. Avec le toluène le dégagement gazeux cesse 12 à 24 heures après le commencement de la fermentation. La proportion de sucre fermenté est à peu près de 2 0/0. Voici quelques résultats obtenus avec une levure accoutumée au galactose et additionnée soit de glucose, soit de galactose.

				Sucre fermenté 0/0	Poids de levure en mill.
Levure de vin mise en présence de	2 c. c. Sol. glucose	+ 1 c. c. toluène.		1,7	53
—	— galactose	+ —		1,6	50
Lev. de distillerie	— glucose	+ —		1,52	33
—	— galactose	+ —		1,91	30

Le toluène agit sur l'acclimatation et aussi sur la fermentation alcoolique et avec la même énergie, quelle que soit la nature du sucre décomposé.

Cette action du toluène est due à l'influence de ce corps augmentée de celle de l'alcool.

Il suffit d'ajouter des solutions sucrées additionnées de 1 0/0 d'alcool avec le toluène pour ne pas constater de fermentation. Le protoplasma de la cellule est atteint, car en faisant macérer une levure dans l'eau additionnée de 1 0/0 d'alcool et de 1 c. c. de toluène on constate après 4 jours que la levure est morte. Au microscope, la levure laisse voir un protoplasma très granuleux.

Le toluène seul exerce déjà une certaine action sur les levures. Si l'on prend une levure acclimatée ou non au galactose et qu'on la fasse macérer dans l'eau additionnée de toluène pendant 8 jours à 25°, on constate un retard dans l'apparition du dégagement gazeux, quand on fait agir de la levure sur le galactose ou un autre sucre.

Voici pour une levure ce qu'on trouve :

		Dégagement gazeux manifesté au bout de :	Poids de levure en millig.
Levure acclimatée mise en présence de :	2 c. c. Sol. glucose 10 % + 0 c. c. 2 toluène.	2 heures	73
	— galactose 10 % + —	2 heures	70
Levure non acclimatée mise en présence de :	2 c. c. Sol. glucose 10 % + 0 c. c. 2 toluène.	6 heures	84
	— galactose 10 % + —	3 jours	100
	— glucose.....	2 heures	88
	— galactose.....	2 jours	80

Dans toutes ces expériences, la levure non acclimatée semble plus sensible à l'action du toluène que la levure acclimatée.

L'action combinée de toluène et d'alcool, comme dans les expériences de Biernacki est plus forte que celle résultant de la somme des actions réciproques de ces deux corps.

Quand on cultive les levures dans des milieux riches en peptone. L'influence du toluène se fait beaucoup plus sentir.

Nous mettons *en masse* dans des tubes une levure provenant d'une culture dans l'eau de touraillons additionnée de 1 0/0 de peptone et on ajoute dans chacun une solution de toluène dans l'eau. Au bout de 4 jours la quantité de toluène est évaporée, on ajoute alors une solution de galactose et on constate ceci. Dans les tubes qui renferment la levure acclimatée un dégagement gazeux commence après 24 heures, tandis que les levures non acclimatées soumises à ce traitement sont devenues incapables de s'acclimater. La levure est cependant vivante, il suffit de la transporter dans un milieu nutritif sucré pour qu'elle se développe facilement.

Reprenons les tubes contenant une *levure en masse* acclimatée au glucose en présence de peptone, mais au lieu de la faire agir sur une solution de galactose, nous introduisons dans le tube une solution de glucose avec 0,2 c.c. de toluène. On ne constate de fermentation qu'après la disparition du toluène. La levure n'était pas morte et il y a lieu de penser que pendant la macération dans l'eau additionnée de toluène, celle-ci a perdu sa zymase détruite par ce traitement.

La levure non accoutumée traitée comme nous venons de l'indiquer et, transportée dans l'eau de touraillons additionnée de galactose, ne peut se développer ni faire fermenter ce sucre. Voici une levure qu'une simple macération dans l'eau additionnée de toluène rend donc inactive vis-à-vis du galactose.

Pour lui rendre son activité il suffit d'ajouter une trace de glucose qui, redonnant la jeunesse aux cellules, les mettent dans les conditions nécessaires pour s'accoutumer au galactose.

Les levures accoutumées soumises au traitement du toluène peuvent très bien se développer dans l'eau de touraillons galactosée. Il semble même que, dans ces conditions, la zymase de ces levures résiste bien mieux que celle des levures non accoutumées.

Comme ces phénomènes d'acclimatation sont assez généraux nous pouvons rechercher des rapprochements chez les microbes avec les faits que nous constatons.

Ainsi cette action du toluène sur la zymase d'une levure peut être rapprochée, à mon avis, avec ce qui se passe chez un microbe très virulent. Ce microbe, placé primitivement dans des conditions très favorables, se développe, mais son activité passe par un maximum. Au bout d'un certain temps les conditions deviennent défectueuses et les cellules résistent d'autant moins que l'activité avait été plus grande, le microbe perd de sa virulence. Pour la récupérer il lui faut des conditions spéciales, comme dans notre expérience la présence du glucose est nécessaire à la levure.

On peut remplacer l'eau de touraillons peptonisée par d'autres milieux, mais les résultats sont moins frappants. Ils diffèrent, suivant les levures.

Voici quelques résultats :

					Durée de l'accoutumance.
Levure de vin cultivée dans	eau de levure peptonisée	1 % +	saccharose.		9 jours
—	liquide Laurent	—	1 % +	—	8 jours
Lev. de distill.	—	eau de levure	—	1 % +	—
—	—	liquide Laurent	—	1 % +	—
					∞
					9 jours

Mais où l'embarras commence, c'est quand on veut fournir une explication satisfaisante des résultats obtenus. On pourrait dire, par exemple, en admettant avec Buchner que l'action des diastases protéolytiques détruit la zymase, que la peptone a favorisé la sécrétion de ces diastases et qu'en présence de toluène ces diastases protéolytiques ont continué à agir, peut-être ont augmenté d'activité et ont détruit la zymase. Cette explication ne repose sur aucun fait bien précis. La vérification est difficile, et les expériences que j'ai entreprises dans cet ordre d'idées ont toujours abouti à des résultats négatifs. Je veux bien croire que ces insuccès n'infirment rien, les diastases protéolytiques agissantes pouvant ne pas diffuser.

On peut donner une autre explication, qui ne nous renseigne pas davantage sur le mécanisme de la destruction de la zymase, mais qui repose sur une observation dont la généralité semble s'étendre sur beaucoup de cellules. Toutes les fois qu'on augmente outre mesure l'activité d'une cellule, il se produit bientôt une réac-

tion inverse qui tend à affaiblir cette cellule rendue précédemment trop active. Ce fait semble général même pour les cellules des organismes. Quand on fournit des excitants à des animaux, à l'excitation survient l'abattement. Si à ce moment une cause nuisible survient, l'action nuisible se trouvera augmentée par suite de l'affaiblissement de la cellule. C'est ce qui arrive aux levures développées en présence de peptone et sur lesquelles le toluène a ensuite agi. Du reste, toute cause capable d'augmenter l'activité d'une cellule doit être suivie d'un affaiblissement. Ainsi, le phosphate d'Azn³ remplaçant la peptone dans le milieu de culture fournit des levures sensibles à l'action du toluène, mais moins sensibles que dans le cas de la peptone.

Une levure habituée au glucose agissant sur un mélange de glucose et de galactose additionné de toluène ne fait pas fermenter le glucose seul. Le même résultat est obtenu avec une levure acclimatée au galactose. Pour expliquer ce fait qui semble anormal, nous ferons remarquer que le glucose fermente plus vite que le galactose. Or les petites quantités d'alcool produites au commencement suffisent pour modifier l'intérieur du protoplasma et rendre difficile la diffusion du galactose. En faveur de cette hypothèse, je citerai l'expérience suivante : Sur une levure acclimatée je mets 5 c. c. d'une solution de glucose à 10 0/0 et, la fermentation terminée, je soutire le liquide fermenté et lave la levure à l'eau distillée. J'introduis sur la levure, à la suite de ce lavage, une solution de galactose avec un excès de toluène; dans un autre tube traité de la même manière j'introduis une solution de glucose avec également un excès de toluène. Je dose l'acide carbonique dégagé et j'obtiens les résultats suivants.

	CO ₂ dégagé à 0° et à 760 ^m mm
Tube renfermant solution de glucose.....	4 c. c. 7
— — — galactose.....	0 c. c. 8

Cette différence ne peut guère s'expliquer que par la difficulté de la diffusion du galactose dans un protoplasma ainsi vieilli.

En résumé, le toluène, comme l'acide borique, empêche l'accoutumance des levures, mais son action s'exerce également sur la zymase, dont il facilite la destruction, surtout si la levure

n'est pas acclimatée, et dans des conditions spéciales définies dans ce paragraphe.

Son action s'exerce encore sur le protoplasma quand il est mélangé à l'alcool. La mort de la cellule survient alors très rapidement.

SUBSTANCES AGISSANT SUR LA FERMENTATION DU GALACTOSE. — Étudions maintenant certains corps qui sont sans influence sur l'acclimatation des cellules mais dont l'action peut être plus nuisible dans le cas d'une fermentation de galactose que dans celui d'une fermentation de glucose. Parmi celles-ci je citerai pour commencer les acides.

Influence de l'acide malique. — Je cite le cas de l'acide malique, ayant déjà parlé au chapitre II de l'influence de l'acide tartrique.

Si on fait agir une *levure en masse* accoutumée ou non au galactose sur une solution de galactose ou de glucose, additionnée d'acide malique, on constate au bout d'un temps plus ou moins long, suivant que la levure est ou non acclimatée, un dégagement gazeux, qui cesse assez vite quand la levure agit sur le galactose.

Voici en effet quelques chiffres.

Liquide introduit dans chaque tube contenant 70 milligrammes de levure non acclimatée.						Sucre fermenté en milligr.
2 c. c.	Solution de glucose à 12 °/o					240
—	—	de galactose à 13,2 °/o				264
—	—	de glucose + 1 c. c. Sol. acide malique à 2,75 °/o				240
—	—	de galactose + —	—	—	—	204
—	—	de glucose + —	—	—	5,5 °/o	240
—	—	de galactose + —	—	—	—	401
—	—	de glucose + —	—	—	11,0 °/o	240
—	—	de galactose + —	—	—	—	29

L'action de l'acide malique est indépendante du poids de levure employé. Ainsi, au lieu de 70 milligrammes, nous faisons agir 7 milligrammes seulement¹ de levure additionnée d'acide malique. Nous trouvons comme sucre fermenté :

La levure reçoit.						Sucre fermenté en milligr.
2 c. c.	Sol. de glucose à 18 °/o + 1 c. c. Sol. acide malique à 2,75 °/o					366
—	de galactose à 21 °/o + —	—	—	—	—	366
—	de glucose à 18 °/o + —	—	—	—	5,5 °/o	360
—	de galactose à 21 °/o + —	—	—	—	—	267

1. Pour obtenir une petite quantité de levure, nous opérons ainsi : On introduit 40 c. c. dans l'eau de touraillons sucrée dans un tube à essai. On ensemeence et la fermentation terminée, on soutire le liquide fermenté en laissant la levure au fond du tube.

L'influence de la nature du milieu originel se fait également sentir ici. Ainsi l'action de l'acide malique sur la fermentation du galactose est plus faible quand la levure s'est développée dans un milieu riche en peptone ou en phosphate d' AzH^3 .

Avec la même levure dont j'ai rapporté les résultats à la page précédente on trouve :

Levure cultivée dans l'eau de touraillons peptone 2 o/o additionnée de :		Sucres fermentés en milligr.
2 c. c. glucose 18 o/o +	4 c. c. acide malique à 5,5 o/o	360
— galactose 21 o/o +	— — — —	378
Levure cultivée dans l'eau de touraillons phosphate d' AzH^3 2 o/o additionnée de :		Sucres fermentés en milligr.
2 c. c. glucose 18 o/o +	4 c. c. acide malique à 5,5 o/o	360
— galactose 21 o/o +	— — — —	298

Enfin nous ajouterons pour finir que le rapport

$$R = \frac{\text{vitesse fermentation du glucose}}{\text{vitesse fermentation du galactose}}$$

varie entre 1,5 à 1,7, après 24 heures de fermentation. Nous voyons encore ici que ce nombre varie peu.

En résumé, l'acide malique n'empêche pas l'accoutumance des levures au galactose, mais exerce son action sur la fermentation du galactose, action bien moins sensible quand on remplace ce sucré par du glucose.

Influence de l'alcool. — L'action de ce corps ressemble beaucoup à l'action des acides; ce n'est que par le détail que leurs actions diffèrent. Pour l'alcool le poids de levure intervient.

Déjà, au chapitre II, nous avons vu qu'une levure décomposait moins de galactose que de glucose. Cet arrêt tenait déjà à l'influence de l'alcool. Ajoutons dans des tubes contenant 7 milligrammes environ de levure 5 c. c. d'une solution de glucose ou de galactose additionnée de doses variables d'alcool, de façon à obtenir des concentrations de 4,4 0/0, 8,3 0/0, 13 0/0 en volume.

Avec une levure accoutumée nous avons obtenu les résultats suivants :

Chaque tube reçoit		Sucres fermentés o/o
5 c. c. de glucose à 15,01 o/o +	4,4 o/o alcool.	15,01
— de galactose à 18,59 o/o +	— —	7,52
— de glucose à 15,01 o/o +	8,3 o/o —	15,01
— de galactose à 18,59 o/o +	— —	4,47
— de glucose à 15,01 o/o +	13,0 o/o —	11,41
— de galactose à 18,59 o/o +	— —	1,30

L'alcool n'influe pas sur l'acclimatation, mais exerce une action nuisible sur la fermentation du galactose.

Son action dans ce cas pourrait tenir à une coagulation du protoplasma des cellules. Or il n'en est rien et il semble bien que dans ces conditions l'influence de l'alcool se fasse seulement sentir sur la zymase. Si dans chaque tube ayant fait fermenter une certaine quantité de galactose on ajoute une solution de glucose additionnée d'une dose suffisante d'alcool, de façon à ne pas changer le degré alcoolique du liquide de chaque tube, on obtient une fermentation, le galactose restant inaltéré.

L'action de l'alcool sur la zymase semble comparable à l'action du maltose sur l'amylase.

L'intérieur du protoplasma était, bien entendu, très granuleux et, dans ces conditions, le galactose diffuse mal.

Cette condition serait insuffisante pour expliquer l'arrêt de la fermentation du galactose, car en augmentant la dose de levure, l'influence de l'alcool diminue.

Si, en effet, on opère avec une *levure en masse* et qu'on fasse agir celle-ci sur une solution de glucose ou de galactose additionnée d'alcool de façon à obtenir une concentration alcoolique de 10 0/0 et 15 0/0 d'alcool, on trouve que la fermentation s'arrête pour les deux sucres quand la dose d'alcool est identique dans les deux cas.

Voici en effet les quelques résultats obtenus :

La levure reçoit.	Temps mort.	Sucre fermenté %	Poids levure milligr.
2 c. c. Solution de glucose à 16,45 %	2 h.	16,45	65
— — de galactose à 13,41 %	2 h.	13,41	82
— — de glucose à 16,41 %	3 h.	16,45	84
— — de galactose à 13,41 %	3 h.	13,41	85
— — de glucose à 16,45 %	8 h.	7,95	125
— — de galactose à 13,41 %	8 h.	8,40	120

Il est naturel d'admettre que l'alcool exerce son action coagulante sur le protoplasma des cellules quand sa concentration atteint un certain degré, et indépendamment du poids de levure en présence, que par conséquent on ne peut attribuer à un défaut de diffusion l'arrêt de la fermentation du galactose quand, avec une dose moindre de levure, la fermentation du galactose est arrêtée pour un degré moindre d'alcool.

Si on fait agir la levure en masse aussitôt l'arrêt de la

fermentation obtenue, aucun autre sucre ne peut être décomposé par la levure. Même en évaporant l'alcool la fermentation continue difficilement, ce qui indique une modification intérieure de la cellule.

En résumé, l'alcool agit de deux façons : sur la zymase quand il y a peu de cellules, et sur le protoplasma quand la quantité de levure est en grand excès.

Action de quelques autres corps. — Pour terminer je dirai quelques mots de deux antiseptiques puissants : le sublimé (HgCl_2) et l'acide phénique ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$).

Le sublimé à faible dose est un antiseptique puissant. Empêche-t-il l'acclimatation au galactose ? En opérant avec la *levure en masse*, j'ai pu me convaincre que non, et avec une levure non accoutumée la quantité de sucre était la même, que ce soit du glucose ou du galactose.

Voici quelques résultats :

Les tubes reçoivent.				Sucre fermenté %	Poids levure en milligr.
2 c. c.	Sol.	glucose à 22	°/o + 0 ^{sr} ,003 HgCl_2 .	22,00	62
—	—	galactose à 13,41	°/o + — —	13,41	55
—	—	glucose à 22	°/o + 0 ^{sr} ,006 —	2,38	48
—	—	galactose à 13,41	°/o + — —	2,13	57

L'acide phénique agit un peu de la même manière. Il n'entrave pas l'accoutumance.

Il est donc intéressant de faire remarquer qu'un antiseptique puissant, pouvant arrêter rapidement la fermentation et le développement des cellules, puisse agir, à dose légèrement au-dessous de la dose antiseptique, avec moins d'énergie pendant le travail d'acclimatation que d'autres corps tels que l'acide borique bien moins antiseptiques que les précédents.

Il n'y a donc aucune relation entre la puissance antiseptique et la *puissance antiacclimatante* si on peut s'exprimer ainsi, c'est-à-dire la quantité de substance nécessaire pour empêcher l'acclimatation.

Cette observation peut avoir une certaine importance partout où se manifestent des phénomènes d'accoutumance. Ainsi, dans la lutte contre les microbes, les phagocytes doivent s'accoutumer à leurs toxines. Il peut se trouver quelques substances dans le sang qui retardent et même entravent l'acclimatation des leuco-

cytes, comme il peut se faire que l'emploi de certains antiseptiques sans influence sur l'accoutumance aux toxines, empêche le développement du microbe, arrêtant ainsi la sécrétion de la toxine. C'est à un phénomène du même ordre qu'on peut attribuer l'emploi du chlorure d'iode dans la production du sérum. Peut-être trouverait-on dans cette voie un auxiliaire de sérums.

En résumé, nous avons vu dans ce chapitre que l'on pouvait classer les antiseptiques, dans le cas qui nous occupe, en quatre catégories :

1° Celle renfermant les corps qui n'agissent que sur l'accoutumance (ainsi l'acide borique);

2° Celle renfermant les corps qui, comme le toluène, empêchent l'acclimatation et entravent la fermentation du galactose comme du glucose;

3° Celle renfermant les corps qui, comme l'alcool, les acides, entravent la fermentation du galactose et sont, pour ainsi dire, sans influence sur celle du glucose;

4° Celle renfermant les corps qui, sans entraver l'accoutumance, arrêtent rapidement la fermentation alcoolique de n'importe quel sucre (sublimé, phénol, alcool sur levure en masse).

L'acclimatation d'une levure est donc le résultat d'un phénomène qui nous apparaît comme compliqué, et comme elle est empêchée par certaines substances qui n'arrêtent pas la fermentation, on pourrait croire que le travail qui s'accomplit dans l'intérieur des cellules se produit seulement dans une portion spéciale de la cellule ayant ses exigences propres.

V

LEVURES ACTIVES ET LEVURES INACTIVES ¹

Jusqu'à présent nous avons laissé de côté les levures inactives; le moment est venu de rechercher les relations qui les unissent aux levures actives.

Les travaux de Buchner sur la zymase alcoolique rendaient inexplicable l'existence de levures inactives, et l'idée vint de croire à l'existence de plusieurs zymases. Les levures actives

¹. Afin d'abrégier je désignerai sous le nom de levures actives celles qui décomposent le galactose en alcool et CO₂ et inactives celles qui dans les conditions ordinaires ne décomposent pas ce sucre.

seraient aux levures inactives en présence du galactose comme les levures de lactose sont aux levures de bière vis-à-vis du lactose.

Dans diverses circonstances que nous allons préciser, il est possible de transformer une levure active en une levure inactive. La réciproque est vraie d'après les expériences de M. Dubourg.

Préparons d'abord un milieu de culture très nutritif pour les levures, mais exempt le plus possible de substances hydrocarbonées qui permettent à la levure de se développer dans un tel milieu non sucré. Si on prend l'eau de touraillons, il est bon de transformer les traces d'amidon qu'elle contient en glucose au moyen d'acide acétique; on chasse ensuite cet acide en partie par évaporation. Après ce traitement j'ajoute assez de glucose, de façon à obtenir une concentration de 0,5 0 0 de sucre et j'ensemence avec une levure active.

On se sert de ballons très larges de manière à produire une combustion à peu près complète des substances hydrocarbonées pouvant servir au développement de la levure.

On filtre le liquide au bout de 8 jours; lorsque la fermentation est terminée, on évapore au bain-marie pour chasser les acides volatils, l'alcool ainsi qu'une partie de la glycérine.

L'extrait obtenu redissous dans l'eau distillée servira de milieu nutritif quand on l'additionnera de sucre.

Additionnons un tel milieu de galactose et ensemençons avec une levure active. Si l'opération a été bien faite, le galactose est absolument inattaqué par la levure qui ne se développe pas ou d'une façon très minime. Or, avec les levures actives, nous avons déjà obtenu des résultats semblables. Il suffit de les cultiver dans un milieu riche en peptone et après développement de les faire macérer en présence du toluène ainsi que nous l'avons déjà vu au chapitre précédent. Cette comparaison ne doit pas être poussée trop loin, car nous comparons une levure jeune inactive avec une levure vieille rendue inactive par l'action du toluène. Ce sont les conditions de rajeunissement qui ne se trouvent pas dans ce milieu et qu'une trace de glucose modifie très heureusement.

Pour établir une relation plus étroite entre les levures actives et les levures inactives, employons un milieu minéral. le liquide Laurent par exemple. Certaines levures actives

se développent bien dans le milieu minéral glucosé et non quand il est additionné de galactose. Or, les levures inactives se comportent de la même façon. Il suffit d'ajouter à ce milieu de la peptone pour obtenir une fermentation du galactose avec les levures actives.

Réciproquement une levure inactive peut être rendue active. M. Dubourg a récemment résolu ce problème en cultivant une levure inactive dans un milieu riche en azote (eau de levure à 25 0/0) additionné d'un mélange de glucose et de galactose. La levure se multiplie, fait fermenter le glucose et s'acclimata en partie au galactose.

Je dis en partie, car, en répétant dans les mêmes conditions son expérience, j'ai trouvé que la disparition du galactose dans le milieu de culture n'était pas considérable. Une telle levure *mise en masse* dans un tube et additionnée d'une solution de galactose pur ne fait guère disparaître que 2 à 3 0/0 de sucre, quantité sensible, car elle a été calculée au moyen de l'acide carbonique dégagé, mais qui indique pour la fermentation du galactose une certaine sensibilité de ces levures à l'alcool. Cette même *levure en masse* additionnée d'une solution de glucose à 18 0/0 décompose tout ce sucre. D'après ce que nous avons vu au chapitre précédent, la quantité d'alcool eut été à peu près la même dans ces deux fermentations, si la levure avait été entièrement acclimatée au galactose.

En résumé, toutes les levures pouvant faire fermenter le glucose décomposent le galactose; mais, au point de vue de l'acclimatation, toutes les levures ont des exigences variées. Les levures inactives à ce point de vue sont les plus exigeantes.

Nous avons vu au chapitre I que l'addition du peptone diminue la sensibilité des levures à l'alcool. Or ces levures inactives nous apparaissent comme très sensibles à l'action de ce corps, aussi comprend-on fort bien l'influence de l'azote dans les expériences de M. Dubourg.

Reste à expliquer le rôle que joue le glucose dans les expériences de M. Dubourg. Le glucose est un sucre facilement assimilable par les levures, ainsi que je l'ai signalé au chapitre précédent. Par ce fait, il favorise le rajeunissement des levures.

Or, une levure rajeunie et en voie de multiplication s'acclimata facilement au galactose. L'influence d'une trace de glucose

peut rendre active une levure rendue inactive par le toluène ne peut s'expliquer qu'ainsi. Le protoplasma chez les levures inactives vieillit peut-être très rapidement; la présence du glucose est donc nécessaire pour maintenir pendant un certain temps les cellules dans un état satisfaisant de jeunesse. Nous verrons même au chapitre suivant qu'une certaine quantité de glucose peut favoriser l'accoutumance des levures.

Ceci explique encore les résultats des expériences de M. Bourquelot. En faisant agir une levure de commerce forcément vieille sur du galactose impur, le glucose présent permettait aux cellules de se rajeunir et de s'accoutumer facilement au galactose.

Le milieu nutritif qui remplace le glucose dans les expériences de MM. Tollens et Stone facilite également le bourgeonnement des cellules.

Le rapport $R = \frac{\text{vitesse de fermentation du glucose,}}{\text{vitesse de fermentation du galactose,}}$ que nous avons cherché en répétant les expériences de M. Dubourg, a été trouvé égal à 6 au lieu de 1,6, ce qui nous permet de dire que ces levures ne sont que partiellement acclimatées au galactose.

Cette constatation résulte également de ce fait qu'une telle levure rendue active d'après le procédé de M. Dubourg et commencée dans un milieu nutritif additionné seulement de galactose ne se multiplie presque pas. En résumé, théoriquement, il n'y a pas de levures inactives.

Pratiquement, au moyen de nos milieux de culture nous pouvons faire cette séparation, aussi peut-on accepter et conserver encore cette distinction.

Mais on doit rejeter la notion de fermentation par entraînement de M. Bourquelot, car nous connaissons maintenant le rôle du glucose dans l'acclimatation de levures au glucose dans ses expériences et nous savons que son action n'est pas celle que pensait M. Bourquelot.

VI

MÉLANGE DE DEUX SUCRES ET ACCLIMATATION

Comme nous connaissons maintenant l'influence plutôt favorable du glucose, recherchons si une levure active cultivée en

présence d'un mélange de glucose et de galactose est capable de s'accoutumer rapidement à ce dernier sucre.

L'intérêt qu'il y avait à résoudre cette question était de deux sortes. Au point de vue accoutumance, il permettait de se rendre compte de l'influence possible d'un sucre concurrent du galactose, influence nuisible ou utile. Au point de vue philosophique, nous désirions savoir si une cellule peut, comme les êtres supérieurs, faire preuve de prévoyance pour l'avenir en s'acclimatant rapidement afin de pas éprouver d'arrêt dans son alimentation.

Je ne rapporterai que quelques expériences suffisantes pour pour montrer les résultats auxquels je suis arrivé.

Mais, avant d'entrer dans la solution même du problème, nous devons établir une remarque importante qui nous permettra d'interpréter facilement et utilement les résultats trouvés.

Dumas, dans ses études sur la fermentation alcoolique, avait montré que la durée d'une fermentation était proportionnelle à la quantité de sucre dissous dans le liquide et à peu près indépendante de la concentration de ce corps.

Les expériences de Dumas reprises par Brown et développées plus récemment par J. O'Sullivan, furent confirmées par ces deux savants. Le principe de la proportionnalité de la durée de la fermentation à la quantité de sucre dissous trouvé par Dumas sera désigné sous le nom de *principe de Dumas* afin d'abréger le langage.

Dans leurs expériences ces savants employèrent de la levure toute développée et la faisaient agir sur des liquides de concentrations différentes.

En opérant avec une trace de levure et en l'ensemencant dans des milieux nutritifs on obtient des résultats conformes au *principe de Dumas*, à la condition d'observer la précaution suivante. Une levure en se développant tend à occuper à peu près tout le fond du vase, puis fait fermenter le sucre. Or, pour que le commencement de la fermentation se fasse exactement ou à peu près au même moment dans tous les ballons, il faut que les fonds de ceux-ci soient à peu près identiques.

Voici quelques expériences qui permettent de se rendre compte de la véracité du principe de Dumas dans notre cas particulier.

Expérience I. — 20 c. c. d'eau de touraillons additionnée de :

Ballon A	40 % de glucose.
— B	7,5 % —
— C	5,0 % —

sontensemencés avec une levure pure.

On dose au bout de 48 heures le sucre restant dans chaque ballon et on trouve comme sucre disparu :

Ballons	Sucre disparu %
A	4,62
B	5,04
C	4,67

Quantité à peu près identique pour chaque ballon.

Expérience II. — La même expérience répétée avec des solutions de galactose fournit des résultats semblables :

Ballons	Galactose introduit %	Galactose fermenté %
A	8,70	1,40
B	5,80	4,15
C	2,89	1,18

Expérience III. — En généralisant on peut faire agir une levure sur un mélange de deux sucres dont l'un est fermentescible et l'autre non attaqué par la levure. Ici encore le *principe de Dumas* se vérifie.

Voici une expérience faite avec le *S. Ludwigii*.

0/0 de sucre introduit dans chaque ballon	0/0 sucre fermenté après 40 h.
8,65 % de glucose.....	2,76
4,77 % —	2,92
2,88 % —	2,58
2,88 — + 5,0 % maltose	2,50
4,77 — + 2,50 —	2,84
2,88 — + 7,50 galactose	2,58
4,77 — + 3,94 —	2,55
2,88 — + 5,62 lactose	2,58
4,77 — + 2,81 —	2,94

Expérience IV. — Mais pour vérifier le *principe de Dumas* faut-il employer un milieu nutritif pour la levure employée.

Avec un milieu aussi médiocre qu'un milieu minéral ce principe ne se vérifie plus. Ainsi le liquide Laurent additionné de glucose à différents degrés de concentration fournit les résultats suivants :

Sucre introduit ‰	Sucre fermenté ‰ après 40 heures.
40 ‰ de glucose.	3,50
7,5 —	2,60
5,0 —	2,10

On peut fournir une explication de cette exception. Quand un milieu est très nutritif, l'addition de glucose à différents degrés de concentration n'augmente pas son caractère nutritif. Au contraire, un milieu médiocre se bonifie par l'addition de doses plus élevées de sucre, et dans de tels milieux la levure acquiert une activité plus grande que dans les mêmes milieux moins riches en sucre.

J'ajouterai qu'en opérant avec la zymase de Buchner on obtient des résultats conformes au *principe de Dumas*.

Fermentation de deux sucres. — Pour étudier à différentes époques de la fermentation les quantités de deux sucres disparues, je me suis servi des deux méthodes usuelles. La première consistait à faire des prises à différents moments de la fermentation, la deuxième revenait à analyser une série de ballons semblables sans être obligé de faire des prises. Les deux méthodes sont également bonnes.

Dans les expériences que je vais rapporter, j'éviterai de citer les poids de levure. Les quelques chiffres qui suivent suffisent pour montrer que tous les ballons contiennent un poids à peu près constant de levure.

Eau de touraillons contenant		Poids de levure en milligr.	
Glucose ‰	Galactose ‰	Levure de Bruxelles	Levure de lactose.
—	—	—	—
9,45	0	72	55
4,87	2,96	77	56
0,65	5,92	69	57

Je me suis servi de galactose pur du commerce contenant 10 0/0 de glucose. Ce dernier sucre favorise le développement de la levure et permet de récolter le même poids de levure que dans les autres ballons. Avec le galactose pur le poids de levure serait plus élevé, ce qui rendrait le ballon non comparable avec les autres.

Expérience I. — Préparons une série de ballons contenant de l'eau de touraillons additionnée de différentes doses de galac-

tose avec un autre sucre, par exemple du glucose. Dans notre expérience les ballons contenaient :

Nos des Ballons.	Sucre introduit		Sucre total à 40
	Glucose o/o	Galactose o/o	
1	10,44	0	10,44
2	8,23	2,26	10,49
3	5,82	4,52	10,34
4	3,41	6,78	10,19
5	1,00	9,04	10,04

C'est-à-dire que la concentration du sucre était voisine de 10 0/0 dans chaque ballon. 24 heures après l'ensemencement nous dosons le glucose et le galactose restant comme il a été indiqué au chapitre I^{er}.

Nous trouvons :

Nos des Ballons	Sucre fermenté o/o	
	Glucose	Galactose
1	3,82	0
2	3,66	0,04
3	2,67	0,70
4	1,89	1,45
5	1,00	0,21

Traduisons ces résultats au moyen d'une courbe en portant en abscisses les proportions de sucre introduit dans chaque ballon et en ordonnées les quantités de sucre fermenté. (Fig. 1.)

On constate que la courbe représentant la quantité de galactose fermenté passe par un maximum quand, dans notre expérience, les quantités de galactose et de glucose introduites sont dans le rapport de 2 à 1. Mais nous voyons encore que la levure a pu s'accoutumer au galactose en présence du glucose. Cette levure, dans ces conditions, a donc manifesté des signes de prévoyance et le glucose semble favoriser un peu l'accoutumance dans le ballon 4.

Le moment est venu d'appliquer ici le *principe de Dumas* à nos résultats. Nous rappellerons que dans le *principe de Dumas* on n'envisage que des sucres fermentant avec la même vitesse. Or le glucose fermente 1,6 fois plus vite que le galactose chez une levure acclimatée, et si nous voulons appliquer à la fermentation de ces deux sucres le *principe de Dumas*, il faut considérer que le galactose fermente aussi vite que le glucose. Si cela était, les quantités de galactose fermenté que nous trouverions

seraient 1,6 fois plus fortes que celles trouvées en réalité. Il faut donc multiplier par 1,6 les quantités de galactose fermenté que nous trouvons dans nos expériences, pour pouvoir appliquer le principe de Dumas.

Faisons donc la somme glucose fermenté + galactose fermenté $\times 1,6 = \Sigma$; nous trouvons en portant ces valeurs en abscisses une courbe représentée en traits interrompus qui monte rapidement pour devenir horizontale dans la majorité des ballons. Ce résultat nous indique que dans le ballon 5 la levure n'a pas eu

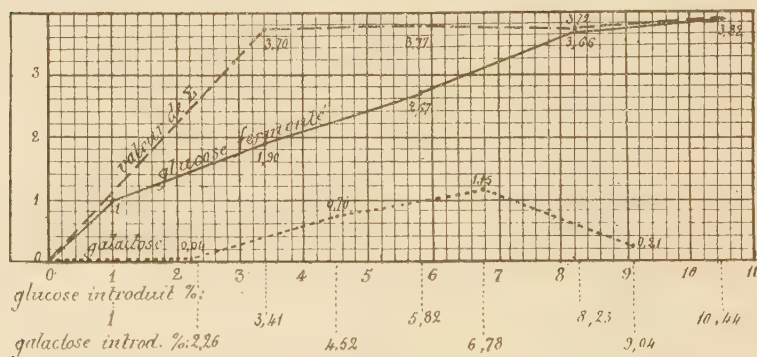


Fig. 1.

encore le temps suffisant pour s'accoutumer, tandis que dans les autres ballons la levure a pu s'accoutumer et faire fermenter le glucose et le galactose en proportions inégales, mais dont la somme Σ est à peu près constante pour tous les ballons.

Mais 48 heures après, en analysant le sucre restant, on trouve :

N ^o des Ballons.	Sucre fermenté %	
	Glucose.	Galactose.
1	8,92	0
2	7,73	0,63
3	5,41	1,28
4	3,21	2,38
5	1,00	3,09

Les courbes obtenues avec ces résultats n'offrent plus de maximum, et la courbe de valeurs de Σ n'est plus horizontale. (Fig. 2).

Ce résultat tient à l'influence de l'alcool dont l'action s'exerce déjà sur la cellule de levure et qui fait varier la valeur de $R =$

vitesse fermentation de galactose
vitesse fermentation de glucose

Il suffit d'opérer avec un milieu riche en pep-
tone dans lequel la levure devient moins sensible à l'influence
de l'alcool pour obtenir pour Σ des courbes sensiblement hori-
zontales. (Fig. 3).

L'influence de l'origine de la semence est nulle sur le
résultat.

Si au galactose on ajoute du levulose au lieu de glucose
dans les proportions indiquées ci-dessous :

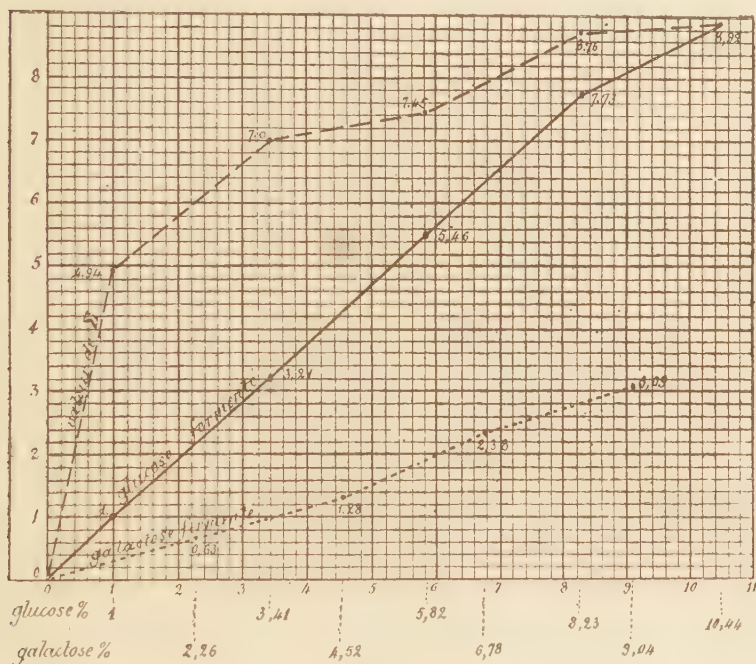


Fig. 2.

Nos des Ballons	Levulose introduit %	Galactose introduit %
1	10,44	0
2	8,08	2,26
3	5,72	4,52
4	3,36	6,78
5	1,00	9,04

On remarque que la levure laisse le galactose intact tant
qu'elle a à sa disposition du levulose (fig. 4). Cette action du
levulose retardant l'accoutumance des levures au galactose se
retrouve chez toutes les levures que j'ai étudiées.

Ayant fait agir cette levure sur un mélange de galactose-saccharose, j'ai constaté que les cellules s'acclimentent au galactose moins vite que dans le mélange glucose-galactose, mais plus vite que dans le mélange levulose-galactose.

En résumé, les levures sont capables de s'acclimater au galactose en présence d'un autre sucre. Pour quelques-unes l'accoutumance est plus rapide, surtout pour certaines concen-

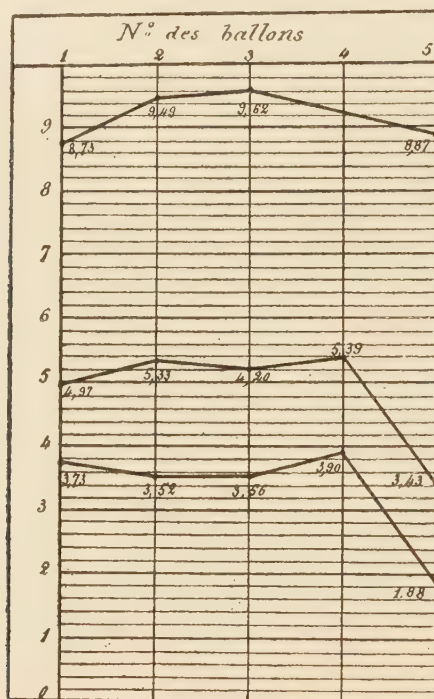


Fig. 3.

trations, mais ce qui est général c'est l'influence retardatrice du levulose sur ce phénomène d'accoutumance.

Expérience II. — Les levures de lactose vont nous donner l'occasion de faire quelques remarques intéressantes, c'est pourquoi je m'étendrai un peu sur cette expérience.

On sait qu'à l'intérieur des cellules de ces levures existe une diastase appelée lactase susceptible de décomposer le lactose en glucose et galactose.

Si on fait agir une de ces levures sur un mélange glucose

lactose, ce dernier sucre se décomposant dans l'intérieur de la levure en glucose et galactose, le tout revient à une fermentation du mélange glucose-galactose.

Voici les mélanges de sucres que je faisais dans l'eau de touraillons qui me servait de milieu de culture.

Nos des Ballons.	Sucre introduit ‰		Nos des Ballons.	Sucre introduit ‰	
	Glucose.	Galactose		Glucose.	Lactose.
1	7,89	2,19	5	7,65	2,83
2	5,58	4,38	6	5,10	5,66
3	3,28	6,57	7	2,56	8,49
4	0,97	8,76	8	0	11,32
			9	10,08	0

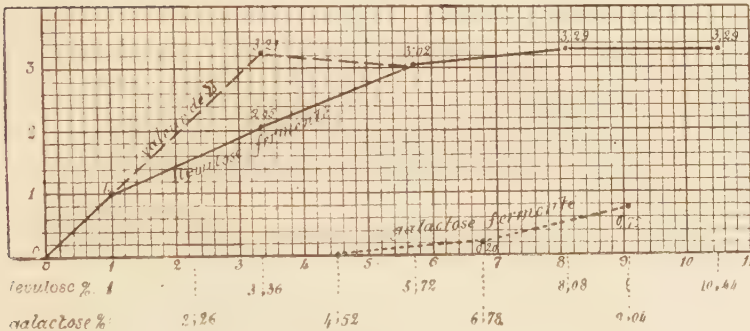


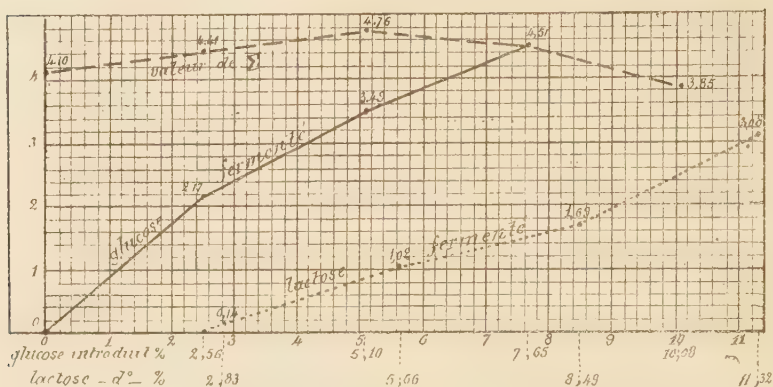
Fig. 4.

Par suite de la décomposition du lactose dans l'intérieur de la cellule de levure, nous pouvons calculer les proportions de glucose et de galactose qui se trouveraient dans le milieu de culture si le lactose venait à être hydrolysé complètement

Nos des Ballons.	Sucre introduit ‰	
	Glucose.	Galactose.
5	9,44	1,49
6	8,08	2,98
7	7,03	4,47
8	5,96	5,96

Or, il est impossible de retrouver dans le milieu de culture une trace de glucose ou de galactose provenant de la décomposition du lactose et sans pouvoir dire que les mélanges des ballons 5, 6 et 7 sont bien ceux indiqués ci-dessus, le mélange du

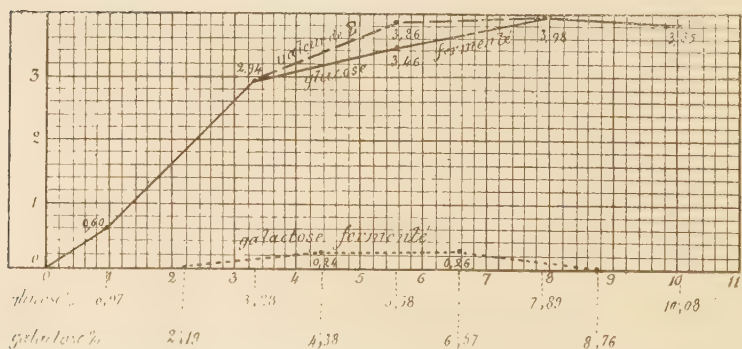
ballon 8 est bien celui qui se trouve dans l'intérieur de la cellule.
Or, voici ce qu'au bout de 48 heures nous trouvons :



Nos des Ballons.	Sucre fermenté %	
	Glucose	Galact. ou lact.
1	3,98	0
2	3,46	0,24
3	2,94	0,26
4	0,50	0
5	4,51	0,14
6	3,49	1,02
7	2,17	1,69
8	0	3,07
9	3,85	0

Fig. 6.

Fig. 5.



Comparons les ballons 2 et 8 qui renferment à peu près le même mélange de glucose et de galactose ; mais dans le dernier

ce mélange de sucre est à l'état de lactose. Nous voyons qu'il n'a fermenté que 0,24 0/0 de galactose dans le premier et 3,08 de lactose ou 1,58 0/0 de galactose dans le second.

Les ballons 6 et 7, malgré la présence du glucose, ont eu une proportion très sensible de lactose disparu. Ce sucre favorise beaucoup la fermentation, en particulier celle du galactose, et nous en chercherons la cause au chapitre suivant.

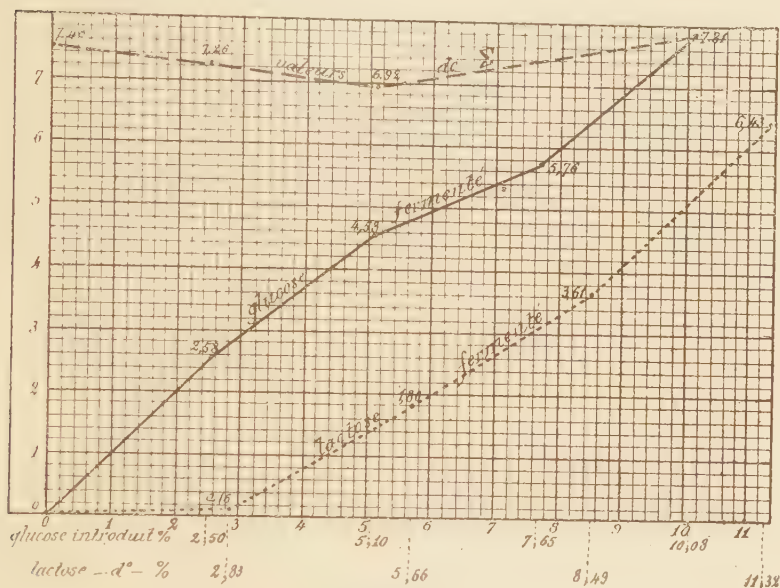


Fig. 7.

Si on dresse la courbe des valeurs de Σ faite en tenant compte du galactose fermenté après l'hydrolyse du lactose et en faisant la somme glucose fermenté + galactose fermenté $\times 1,6$, on trouve que la courbe est surtout horizontale pour les mélanges glucose-lactose; c'est-à-dire pour des levures acclimatées au galactose.

L'explication de ce fait qu'en présence de lactose la levure s'accoutume presque immédiatement au galactose sera donnée au chapitre suivant.

L'analyse faite 48 heures après la première prise n'offre aucun intérêt, sinon que les mélanges glucose-lactose fermentent plus rapidement que les mélanges glucose-galactose et que la

courbe des valeurs de Σ pour le mélange glucose-lactose est

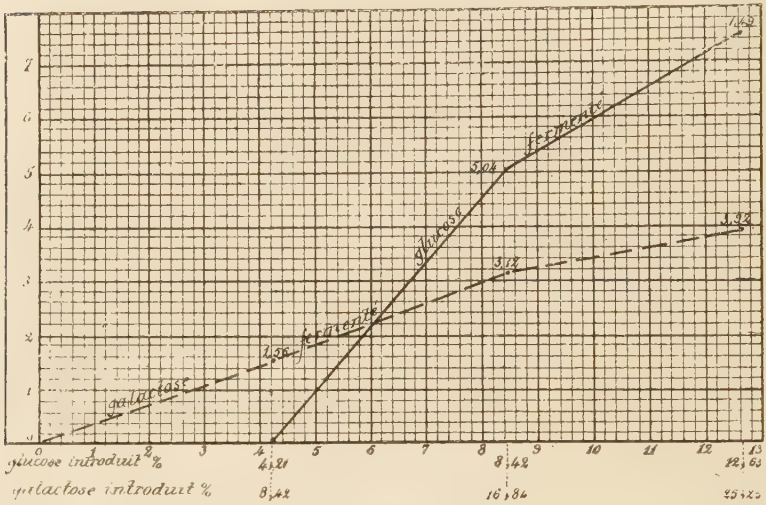


Fig. 8.

sensiblement horizontale (fig. 7). c'est-à-dire que l'alcool

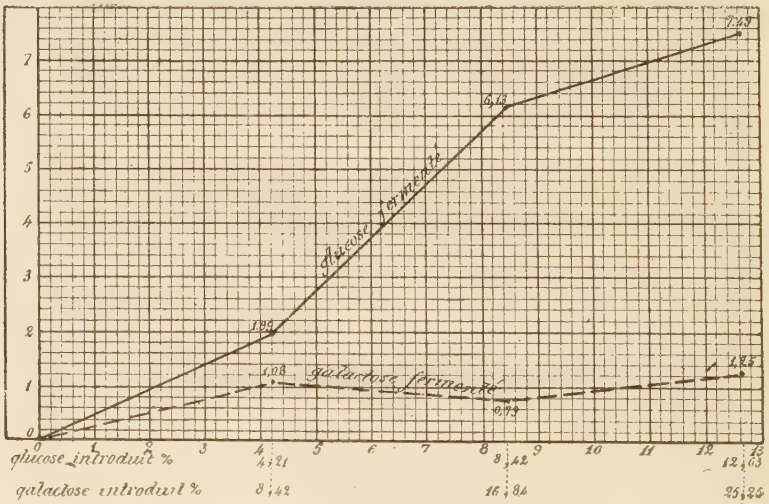


Fig. 9.

n'a pas exercé d'action sensible sur la fermentation du galactose.

Expérience III. — Pour terminer ce chapitre, faisons agir de la levure en masse, accoutumée ou non au galactose sur des mélanges de glucose avec du galactose.

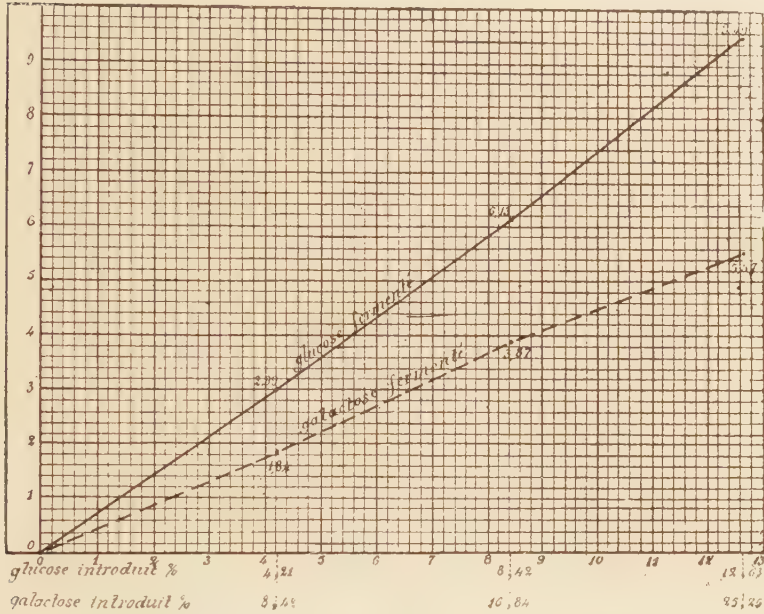


Fig. 40.

Les mélanges dont j'ai étudié la décomposition étaient ainsi constitués :

Nos des Ballons.	Sucre introduit %	
	Glucose.	Galactose.
1	0	25,25
2	4,21	16,84
3	8,42	8,42
4	12,63	0

On analyse les tubes au bout de 2 et de 4 heures. On obtient les résultats suivants :

1^{re} Série. — Levure acclimatée.

	Nos des Ballons.	Sucre fermenté ‰	
		Glucose.	Galact.
Fig. 8. } Après 2 heures.	1	0	3,92
	2	0	3,12
	3	5,04	1,56
	4	7,49	0
Fig. 10. } Après 4 heures.	1	0	5,57
	2	2,99	3,87
	3	6,13	1,83
	4	9,49	0

2^{me} Série. — Levure non acclimatée.

	Nos des Ballons.	Sucre fermenté ‰	
		Glucose.	Galact.
Après 2 heures.	1	0	1,25
	2	1,99	0,79
	3	6,13	1,08
	4	7,49	0
Après 4 heures.	1	0	2,49
	2	3,42	3,51
	3	7,25	1,37
	4	8,42	0

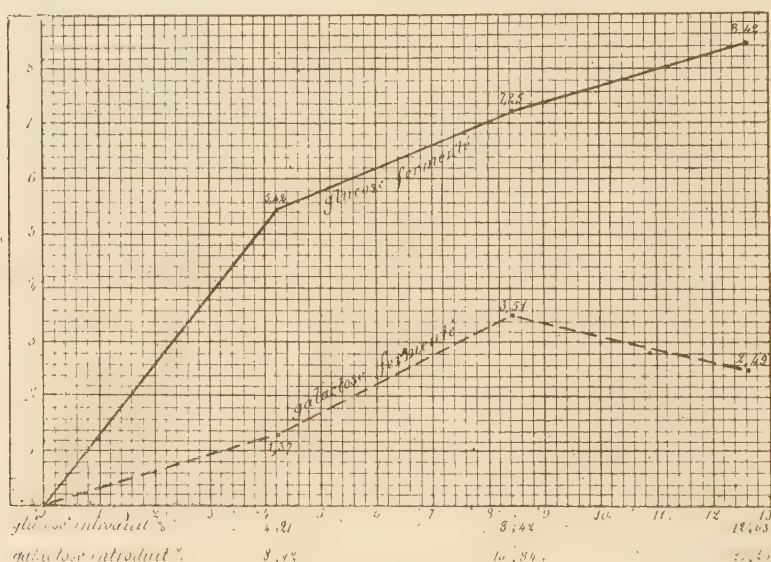


Fig. 11.

En représentant ces résultats par des courbes, nous constatons que les levures acclimatées dans les mélanges indiqués ci-dessus font disparaître le galactose plus vite que le glucose quand il y a peu de ce sucre. Pour les autres résultats, on retrouve à l'inspection des courbes les résultats déjà trouvés dans l'expérience I.

En résumé, en présence de glucose, les levures peuvent s'accoutumer au galactose, ce corps favorisant même l'acclima-

1. Nous ne donnons pas ici les courbes des valeurs de Σ , l'erreur possible dans ces expériences où le sucre fermenté est dosé par différence étant assez sensible.

tation pour quelques levures. Chez les levures de lactose l'accoutumance est très rapide quand on les fait agir sur le mélange glucose-lactose. La présence du glucose semble être indifférente dans ce cas.

Le lévulose a toujours empêché ou retardé beaucoup l'accoutumance des levures au galactose. J'ajouterai qu'en présence de glucose et de saccharose la levure, en s'acclimatant rapidement à ce dernier sucre, a fait preuve d'une certaine prévoyance.

Enfin, ce qui ressort de ce chapitre, c'est la confirmation de ce que nous avons appelé le *principe de Dumas* et même sa généralisation dans le cas de deux sucres fermentescibles.

VII

INFLUENCE DE L'ACCLIMATATION SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES CELLULES

Le phénomène d'accoutumance nous apparaît déjà assez complexe. En étudiant l'action du toluène sur ce phénomène, nous nous sommes rendu compte que les cellules acclimatées s'étaient modifiées de façon à devenir moins sensibles à l'action de cet antiseptique. Pénétrons un peu plus dans l'étude des changements cellulaires qui se produisent sous l'influence de l'accoutumance, que nous allons voir être très importants.

Au chapitre IV, nous avons vu qu'une levure cultivée dans un milieu riche en peptone et mise ensuite à macérer dans l'eau additionnée de toluène perdait sa zymase. Examinée au microscope, une telle levure possède un protoplasma granuleux, indice d'un vieillissement assez accentué. Le temps que met la zymase à disparaître n'est pas le même si on opère avec une levure accoutumée ou non au galactose. Avec les premières, il faut les laisser macérer pendant 15 jours, pour quelques-unes trois semaines, en présence du toluène, tandis que, pour les secondes, au bout de 4 jours le résultat cherché est obtenu. Supposons que nous disposions de levures accoutumées ou non au galactose, mais dont la zymase a été détruite. Portons-en une trace de chacune dans l'eau de touraillons galactosée, voici ce qu'on constate :

La levure acclimatée, malgré son vieillissement certain, se rajeunit très bien; la levure non acclimatée ne peut, dans ces conditions, se développer. Comme nous l'avons déjà vu, l'addition, au milieu de culture, d'une petite quantité de glucose redonne à la levure sa vitalité en même temps qu'elle favorise son accoutumance au galactose.

Voici donc une levure qui, par suite de son acclimatation, possède la faculté qu'elle n'avait pas avant de se rajeunir dans un milieu nutritif galactosé.

Les levures inactives que nous avons acclimatées en partie au galactose, en nous servant de la méthode indiquée par M. Dubourg, ensemencées dans l'eau de touraillons galactosée, se développent très peu. Elles sont dans le même cas que des cellules vieilles actives, mais non acclimatées.

Ces constatations suffisent déjà pour nous montrer les changements profonds qu'une acclimatation à un sucre peut produire. Une nouvelle preuve résulte encore dans les changements survenus dans la sécrétion des diastases.

M. Duclaux a montré depuis longtemps l'influence du lait et de l'amidon sur la sécrétion de la casease et de l'amylase chez le *penicillum glaucum*.

Chez les levures, un tel exemple n'a jamais été fourni. Les levures, comme toutes les cellules, sécrètent un grand nombre de diastases qui ne sont pas toutes connues. On connaît encore mal les diastases proteolytiques qui doivent ramener la matière albuminoïde à l'état d'ammoniaque, comme l'amylase¹ ramène l'amidon à l'état de glucose; mais on connaît assez bien les autres diastases, telles que la sucrase, la lactase, la melibiase, la maltase, même l'amylase, qui s'attaquent aux substances hydrocarbonées.

Si on fait agir une levure de bière, par exemple, acclimatée ou non au galactose, *mise en masse* dans un tube sur une solution de saccharose ou de maltose, l'expérience démontre que l'activité de ces deux diastases est indépendante de l'origine de la levure. Ce qu'on exprime en disant que la sécrétion de ces deux

1. On remarquera que le terme d'amylase que j'emploie n'est pas correct, car pour ramener l'amidon à l'état de glucose, il faut trois diastases superposées : l'amylase proprement dite, la dextrinase et la maltase. Le terme amylase employé ici l'est dans un sens général.

diastases est la même chez les levures acclimatées que chez les levures non acclimatées.

La sucrase est une diastase qui dialyse très bien ; nous avons répété l'expérience précédente en extrayant des levures, accoutumées ou non au galactose, la sucrase qu'elles contenaient : la quantité de sucre interverti était la même, quelle que soit l'origine de la sucrase.

On peut répéter l'expérience précédente plus facilement.

On place une *levure en masse* en présence d'une solution de saccharose et de toluène. La fermentation alcoolique dans ce cas est très lente, l'hydrolyse du saccharose est très rapide. Or les résultats trouvés par cette méthode sont conformes aux précédents.

Lactase. — M. E. Fischer a extrait des grains de képhir ou de la levure de lactose séchée un peu de lactase, diastase qui dédouble le lactose en glucose et en galactose d'après la formule :



La lactase qu'il obtenait ainsi était peu active : ce savant eut recours à la phenylhydrazine pour différencier les produits de l'hydrolyse.

Pour extraire la lactase, j'ai employé le procédé dont M. Hill s'est servi pour ses études sur la réversibilité des diastases.

On commence par sécher la levure de lactose à 25° dans le vide en présence de $\text{SO}^4 \text{H}^2$. La levure une fois sèche, on la pulvérise et la porte à l'étuve Gay-Lussac dont on élève la température jusqu'à 50° pendant 1 heure ; puis, pendant la seconde heure, on porte la température de 50 à 100°. Cette dernière température est maintenue constante pendant 6 heures consécutives.

Ce traitement fini, on laisse la levure refroidir et on extrait la diastase comme on va l'indiquer plus loin. Ce traitement a pour but de favoriser la dialyse de nombreuses substances albuminoïdes sous l'influence de la chaleur. On constate en effet qu'en traitant par l'eau une levure ainsi traitée et portant ensuite cette eau à l'ébullition, on obtient un précipité coagulé de matières albuminoïdes, résultat qu'on n'aura pas obtenu avec

de la levure non séchée et chauffée. La lactase, comme les matières albuminoïdes, filtre également à travers la membrane de levure et attaque la lactose à l'extérieur de la cellule.

Pour extraire la lactase de la levure sèche, on en broie un gramme avec 10 c. c. d'eau distillée au moyen d'un agitateur. Après avoir laissé reposer une heure, on décante le liquide qu'on filtre et qu'on additionne de toluène. On ajoute sur la levure 10 autres c. c. d'eau et on recommence le broyage comme précédemment. Le liquide est décanté et ajouté au précédent. La levure est laissée macérer pendant 24 heures dans un endroit frais en présence de 10 c. c. d'eau additionnée de toluène. Le liquide est filtré après ce temps.

On obtient environ 24 c. c. de liquide renfermant de la lactase. Ce liquide décompose le lactose en glucose et en galactose, sucres qu'on différencie comme nous le verrons.

Chauffé à 100° il est sans action sur le lactose, la diastase ayant été tuée.

J'ai reconnu qu'on n'extrayait pas complètement la diastase des cellules par ce procédé, et pour comparer l'activité de la lactase dans les levures accoutumées ou non au galactose je fais directement agir la levure de lactose séchée et tuée à 100° sur la solution de lactose et en présence de toluène. Le liquide de macération m'a servi pour démontrer que la décomposition du lactose était due à un phénomène diastasique.

Après l'action de la lactase nous avons trois sucres à différencier : le lactose inattaqué, le glucose et le galactose.

Ces sucres peuvent être différenciés en évitant l'emploi de la phenylhydrazine. On se sert de la propriété que possède les levures de ne pas attaquer le lactose même en présence d'autres sucres fermentescibles, le glucose et le galactose disparaissant par la fermentation. On sépare le galactose du glucose au moyen du *S. Ludwigii* qui attaque seulement ce dernier sucre.

On opère de la façon suivante : La solution de lactose après l'action de la lactase est divisée en trois parties égales :

Dans la première, on dose le sucre total restant au moyen de la liqueur de Fehling. On a en bloc le glucose, le galactose et le lactose dissous dans le liquide.

Dans la deuxième partie qu'on stérilise, onensemence la levure de bière de Bruxelles par exemple, qui attaquera le glu-

cose et le galactose et laissera le lactose. En dosant le sucre restant, nous obtiendrons la quantité de lactose inattaqué.

Enfin, la troisième partie, stérilisée également comme la deuxième, estensemencée avec une levure inactive comme le *S. Ludwigii* qui attaquera le glucose et laissera inattaqués le galactose et le lactose. Un dosage du sucre restant nous fournira le galactose et le lactose dissous dans la solution. On connaît la quantité de lactose, il est facile de déduire par différence le galactose.

Il reste à déterminer le glucose. On retranche de l'analyse du sucre de la première portion la quantité de lactose et de galactose qu'on a trouvée, et ce qui reste représente le glucose.

Avec 10 c. c. d'une solution de lactase préparée comme je l'ai indiqué plus haut agissant sur 1 gramme de lactose, on obtient l'hydrolyse complète de ce sucre à 25° au bout de 36 heures. Les quantités de glucose et de galactose trouvées sont celles que prévoit la formule de l'hydrolyse indiquée plus haut.

En extrayant la lactase de levures ayant plusieurs origines, et en comparant l'activité de chacune d'elles, on obtient les résultats suivants :

N° des tubes.	Origine de la levure.	Lactose hydrolysé en 24 heures.	Concentration.
A	lactose	766 milligrammes	} 4 ^{re} 307 dans 10 c.c. eau
B	galactose	650 —	
C	glucose	480 —	

Dans ce cas, l'activité est respectivement de 4-3,5 et 1 si on prend comme unité l'activité de la diastase du tube *c*.

Les différences sont un peu moins considérables si on fait agir directement la levure séchée sur la solution de lactose en présence de toluène. On trouve comme résultats :

	Origine.	Lactose hydrolysé après 48 heures.
a)	lactose	712 milligrammes.
b)	galactose	690 —
c)	glucose	350 —

L'acclimatation a donc encore comme résultat de favoriser non seulement la fermentation du galactose, mais encore d'augmenter l'activité de la lactase. En prenant encore comme unité d'activité celle du tube *c*, on trouve que dans cette dernière

expérience celle-ci est respectivement de 2, 4,9 et 1 pour les tubes *a*, *b* et *c*.

Il est même inutile de sécher et de tuer la levure pour constater ces différences dans l'activité de la lactase. En introduisant sur une *levure en masse* accoutumée ou non au galactose une solution de lactose, on obtient une différence dans le commencement de la fermentation. Pour peu qu'on ait laissé la levure vieillir, la fermentation du lactose commence par les levures habituées au galactose au bout d'une demi-heure et seulement au bout de 24 heures pour celles habituées au glucose.

Tout le monde sait qu'une levure de lactose décompose ce sucre en alcool et en acide carbonique sans qu'on puisse déceler une trace de glucose ou de galactose dans le liquide extérieur. Or, en faisant agir la levure sèche et traitée suivant la méthode de Hill sur une solution de lactose, on constate dans la liqueur la présence d'une certaine quantité de glucose et de galactose, mais ces deux sucres ne sont pas en quantités égales. On trouve la proportion de 4,12 de glucose et de 3,54 seulement de galactose. La levure semble retenir une partie de ce dernier sucre et ce doit être la raison pour laquelle on ne peut trouver trace de ce sucre dans le liquide de culture lactosé avant tout traitement de la levure.

Ces expériences ont toutes été faites en prenant de la levure qui s'est développée dans un milieu de culture additionnée de 20/0 de sucre.

En diminuant la concentration du sucre dans le milieu de culture, on constate, dans le cas du glucose, une diminution importante de l'activité de la lactase ainsi que du degré d'accoutumance de ces levures.

C'est une relation possible qui nous apparaît entre l'accoutumance et la sécrétion d'une diastase.

Voici un autre exemple : on prend une levure de lactose qu'on fait développer dans de l'eau de touraillons additionnée soit de 10/0 de glucose, soit de 40/0 de ce même sucre. La levure ainsi obtenue est *mise en masse* et reçoit soit 2 c. c. d'une solution de lactose, soit 2 c. c. d'une solution de galactose, le tout additionné de toluène. La fermentation commence vite, mais s'arrête bientôt. On dose la quantité de CO_2 dégagé et on trouve :

					Sucre fermenté %.
Levure cultivée dans E. T.	+	1°/o	glucose, reçoit	2 c.c. sol. lactose.	0,7
—	—	+ 1°/o	—	2 c.c. sol. galactose.	0
—	—	+ 4°/o	—	2 c.c. sol. lactose.	3,00
—	—	+ 4°/o	—	2 c.c. sol. galactose.	0,8

Plus il y a de lactase, plus l'accoutumance au galactose est grande.

On peut encore obtenir un résultat semblable au moyen d'une expérience très délicate.

On prend une *levure de lactose en masse* habituée au glucose. On l'additionne moitié d'une solution de glucose à 1 0/0, d'une solution de lactose à 1,5 0/0 et de toluène en excès. Le lendemain, la fermentation est terminée. On ajoute alors une solution de galactose qui fermente plus rapidement qu'avant l'action du lactose. Le point délicat de cette expérience est de bien noter la fin de la fermentation et de ne pas attendre trop longtemps pour ajouter le galactose, car nous avons déjà vu l'action mortelle exercée par l'alcool et le toluène sur les levures.

On peut donner à ce résultat l'explication suivante :

La levure en présence de lactose a décomposé ce sucre en glucose et galactose. Il a dû se produire en même temps une augmentation dans la sécrétion de la lactase qui a provoqué une légère accoutumance au galactose. De là les résultats obtenus.

En se reportant au chapitre précédent, nous avons vu que la levure de lactose, en présence d'un mélange glucose-lactose et même de lactose seul, s'acclimate beaucoup plus rapidement au galactose qu'en présence du mélange glucose-galactose. Ce résultat s'explique très bien maintenant que nous savons qu'une sécrétion abondante de lactase suffit pour provoquer l'accoutumance de la levure au galactose.

En résumé nous venons de voir que l'accoutumance favorise la sécrétion de la lactase, et inversement que la sécrétion de la lactase diminue la période d'accoutumance des levures au galactose. Voici deux phénomènes qui semblent bien liés l'un à l'autre, ce qui ne doit pas être un pur hasard.

Mélibiose : Le mélibiose est un sucre qu'on obtient en traitant le raffinose (mélétriose) par les acides étendus ou encore par la sucrase, diastase qui hydrolyse le sucre de canne.

Le dédoublement du mélibiose en glucose et en galactose

peut se faire soit en traitant ce sucre par les acides concentrés, soit à la température ordinaire au moyen d'une diastase, la mélibiase. Cette diastase n'attaque pas le lactose comme la lactase n'attaque pas le mélibiose.

En étudiant l'influence de l'accoutumance des levures au galactose, nous sommes arrivé aux mêmes résultats au sujet de la sécrétion de la mélibiase qu'au sujet de celle de la lactase.

On prend une levure basse de Froberg *en masse* dans un tube et habituée à différents sucres. On la laisse vieillir pendant deux jours et on ajoute ensuite 2 c. c. d'une solution de mélibiose pur¹.

Chez les levures habituées à ce sucre ou au galactose la fermentation commence rapidement. Chez les levures habituées au glucose, elle n'a lieu dans ce cas qu'après 5 à 6 jours.

Avec une levure jeune, on constate encore une différence, faible au commencement de la fermentation, mais plus accentuée si on note le temps que met cette levure à faire disparaître 10 0/0 de sucre par exemple.

Si dans le cours de la fermentation on recherche le galactose dans le liquide, on n'en trouve pas. Je ferai remarquer que le galactose fermente dans ce cas presque aussi vite que le glucose, et cependant les levures de bière ne sont pas comme les levures de lactose naturellement acclimatées au galactose.

Voici quelques résultats :

Origine.	Le dégagement gazeux commence après	8.08 % de mélibiose ont disparu après
—	—	—
Glucose.	3 heures.	45 heures.
Galactose	$\frac{1}{2}$ heure.	2 heures.
Mélibiose.	$\frac{1}{2}$ heure.	2 heures.

Des résultats absolument semblables sont obtenus en employant la levure séchée et tuée d'après la méthode de M. Hill.

L'acclimatation des levures au galactose agit donc sur la mélibiase comme sur la lactase.

1. On obtient du mélibiose pur en faisant fermenter du raffinose au moyen d'une levure de bière haute. Dans ce cas le levulose provenant du dédoublement de ce sucre fermente seul et le mélibiose reste pur dans le milieu nutritif.

Au sujet de l'influence de la sécrétion de la mélibiase sur l'accoutumance, nous pouvons citer l'expérience suivante. On fait agir 100 milligrammes de levure de Froberg habituée au glucose sur une solution de mélibiose et sur une solution d'un mélange de glucose et de galactose. On constate que :

Solution de sucre introduite.	La fermentation a lieu au bout de
2 c.c. mélibiose 8,08 %.	15 heures.
1 c.c. glucose à 8,08 + 1 c.c. galactose 8,08.	36 heures.

L'accoutumance a été plus rapide en présence de la solution de mélibiose. En comparant l'action de ce sucre avec ce que nous savons de l'action de la lactase, nous voyons que la sécrétion de la mélibiase favorise l'accoutumance.

En résumé. — Chez les cellules de levures, l'activité ou encore la sécrétion de la lactase et de la mélibiase sont en rapport avec le degré d'acclimatation des levures au galactose et réciproquement la sécrétion de la lactase ou de la mélibiase semble provoquer en partie une accoutumance des levures au galactose. C'est le moment de se souvenir que ces deux diastases agissent sur deux sucres capables de donner par hydrolyse du galactose. Cette coïncidence ne doit pas être un pur hasard et il est probable que du moment que ces deux sucres sont proches parents du galactose, la levure capable de détruire par exemple en même temps le galactose et le lactose le fait par des moyens ayant entre eux une relation assez étroites, et dont l'existence de l'un est liée en partie avec celle de l'autre.

Malgré son caractère théorique, ce chapitre prévoit une conséquence pratique des résultats trouvés. Le raffinose est un sucre qui se trouve en assez grande quantité dans les mélasses. En se dédoublant il donne du lévulose et du mélibiose. Ce dernier sucre disparaît souvent très lentement. Les mélasses contiennent des substances peu favorables aux levures et dans ces conditions celles-ci s'acclimatent difficilement au mélibiose.

En introduisant des cellules acclimatées au galactose, c'est-à-dire sécrétant déjà de la mélibiase, on obtiendrait une fermentation rapide du mélibiose et on pourrait sauver d'une perte certaine une cuve fermentant mal.

VIII

THÉORIE DE LA FERMENTATION DU GALACTOSE. — RELATIONS ENTRE L'ACCOU-
TUMANCE DES LEVURES AU GALACTOSE ET CERTAINS PHÉNOMÈNES BIO-
LOGIQUES

Très brièvement je signalerai les théories émises sur la fermentation du galactose.

La première est celle de MM. Tollens et Stone. Ils désiraient expliquer l'influence du milieu nutritif et attribuaient aux phosphates, aux alcalis, à la chaux, à la magnésie et aux substances azotées, substances nécessaires pour la vie d'une plante, les résultats positifs qu'ils obtenaient.

Cette explication qui laissait de côté le rôle de glucose dans les expériences de M. Bourquelot, glucose qui remplaçait tous les sels et matières azotées du milieu nutritif de MM. Tollens et Stone a dû être abandonnée.

Cremer émit une autre théorie à la suite de ses études sur l'action du *S. Apiculatus* sur la galactose. Dans cette levure cultivée dans l'eau de levure galactosée, ce savant ne put déceler la présence de glycogène, dont MM. Laurent et Leo Errera avaient déjà signalé la présence chez les levures. Cremer eut alors l'idée d'attribuer la non-activité du *S. apiculatus* à l'absence du glycogène, corps qui suivant lui était la forme de transition de tous les sucres avant d'être utilisés par les levures. Cremer appuyait encore sa théorie sur les travaux de F. Hessenland et de J. Salkowski qui ne purent retirer au moyen des sels de cuivre du galactane ou du galactose de leurs levures, tandis que par la même méthode ils retirèrent du mannose, du dextrose, du levulose. D'après Cremer, la levure ne renfermant jamais de galactose ne pouvait pas être capable d'assimiler directement ce sucre. De là le passage nécessaire du galactose en glycogène.

Or, toutes les levures ne possèdent pas de glycogène (levure de lactose). Nous savons, à la suite des expériences de MM. Kayser et Boullanger, que la quantité de ce glycogène varie, suivant l'alimentation. Si on cultive une levure dans un milieu pauvre en sucre, elle ne peut fabriquer de glycogène, n'ayant pas le temps de faire des réserves. Or, les milieux de

culture de Cremer étaient peu nutritifs et ne favorisaient pas la formation de glycogène.

C'est pourquoi il obtint peu de levure, mais il ne pouvait tabler sur l'absence de glycogène la cause de la non-activité de sa levure.

La fermentation directe du galactose par la zymase de Buchner a fini par faire repousser la théorie de Cremer.

En dehors de ces deux théories, on a émis des hypothèses basées sur la transformation *in vitro* du glucose en mannose par exemple, d'après les expériences de M. E. Fischer et de MM. Lobry, Bruyn et Von Ekenstein, celle du galactose en glucose.

J'ai essayé de contrôler ces hypothèses, je n'ai obtenu que des résultats négatifs. Je n'ai jamais pu obtenir de transformation du galactose en glucose. Je ne m'occuperai donc pas de ces hypothèses et je passerai immédiatement au mécanisme de la fermentation du galactose.

Mécanisme de la fermentation du galactose. — On peut faire deux hypothèses : La première, c'est d'admettre que l'accoutumance favorise la sécrétion d'une zymase spéciale, la deuxième suppose seulement une modification de la zymase existante.

Bien entendu, l'existence d'une zymase capable de faire fermenter le galactose explique la période d'accoutumance qu'on constate avec les levures non habituées à ce sucre, mais elle semble en contradiction avec certains faits que nous allons passer en revue.

Supposons qu'il y ait deux zymases. Une levure acclimatée ferait fermenter le glucose et le galactose avec des vitesses différentes suivant les levures. Ces vitesses dépendent du rapport de l'activité des deux zymases qui devrait varier avec la levure. Nous avons vu qu'il n'en est rien.

Le principe de Dumas se trouve vérifié également pour un mélange de deux sucres, (glucose et galactose par exemple). Or si l'acclimatation développait une zymase spéciale, la fermentation du glucose devrait continuer de fermenter comme auparavant et le galactose fermenterait indépendamment de l'autre sucre. Or l'expérience apprend qu'aussitôt que le galactose fermente, la fermentation du glucose diminue.

Un fait qui plaide encore en faveur de l'hypothèse d'une seule diastase est relatif à l'action du toluène sur une levure

accoutumée ou non au galactose. La zymase de la première étant moins sensible que celle de la seconde, on en déduit qu'une transformation de la zymase a pu se produire, la rendant moins sensible à l'action du toluène.

On peut objecter facilement à la théorie d'une modification diastasique l'action de l'alcool sur la fermentation du galactose. Tandis que l'hypothèse de deux zymases expliquerait cette action, il est plus difficile de donner une explication dans le cas d'une seule zymase. On sait fort bien que l'alcool influe sur la zymase alcoolique dans le cas de la fermentation du glucose. Il est permis de croire que l'alcool peut se comporter différemment vis-à-vis d'une même diastase agissant sur deux corps différents.

Du moment que certains corps, dits antiseptiques, entravent plus ou moins l'action d'une diastase, on peut supposer que la substance sur laquelle la diastase agit a une action, faible peut-être mais qui peut devenir sensible en présence d'un corps antiseptique tel que l'alcool.

Nous supposons donc que l'accoutumance a pour but de modifier la zymase alcoolique de façon à la rendre capable d'attaquer le galactose. Bien, entendu ce n'est plus la même diastase qu'avant : du moment qu'elle est modifiée ; on peut très bien dire qu'il y a changement de zymase, il suffit seulement de s'entendre sur les termes de zymases différentes. J'entends par ces mots qu'il serait possible, par un procédé inconnu jusqu'ici, de séparer ces deux zymases de façon que l'une n'attaque seulement que le glucose et l'autre seulement le galactose.

Pourquoi la période d'accoutumance est-elle aussi longue ? Il est probable que le galactose doit avoir pénétré dans une partie de la cellule de façon à provoquer la transformation de cette zymase. Or la diffusion du galactose semble être très longue dans l'intérieur de la cellule. Maintenant la réaction n'est peut-être pas immédiate. La présence du glucose favorise cette transformation pour deux motifs. Il rend d'abord le milieu plus diffusible par le galactose et accélère la transformation. Malgré le rajeunissement, l'acclimatation peut être assez longue, témoin le résultat obtenu dans l'action de la levure sur le galactose pur du commerce. Le glucose disparaît et la levure s'acclimate difficilement. Les levures inactives dans les conditions ordinaires ne sont pas assez vigoureuses pour réagir, il faut les exciter, de là

l'influence de la peptone, corps très nutritif pour les levures, tout en maintenant leur intérieur dans un état de jeunesse absolument nécessaire.

Je signalerai en passant le cas de la zymase de Buchner qui peut faire fermenter le galactose pur. Je crois que la levure de ce savant ne devait pas se comporter autrement que les miennes et qu'elle devait être susceptible d'une accoutumance. Peut-être existe-t-il chez ces levures actives une partie de la zymase transformée, partie difficile à atteindre et d'où peut partir l'acclimatation qui se propagera dans toute la cellule d'une levure acclimatée. C'est une question que j'ai été dans l'impossibilité de contrôler, n'ayant pas les moyens d'extraire de la zymase.

La zymase acclimatée au galactose agit sur le glucose avec la même activité qu'avant toute accoutumance.

L'hypothèse d'une modification dans la nature de la zymase permet, si on admet la théorie de Fischer sur la constitution des diastases, c'est-à-dire une relation entre la constitution de la diastase et le corps sur lequel elle agit, de prévoir la nature des diastases sur lesquelles l'acclimatation pourra exercer une influence. Ce seront les diastases qui agissent sur des corps ayant une certaine relation avec le galactose, comme le lactose ou le melibiose. Ainsi que l'expérience le vérifie ce seront les diastases comme la lactase et la melibiase dont l'activité augmentera chez les levures accoutumées au galactose.

Je passe rapidement sur ces hypothèses pour dire quelques mots de l'assimilation possible entre les levures et les cellules de l'organisme.

Relations entre l'acclimatation et certains phénomènes biologiques.

— Ce travail qui a trait à l'accoutumance de cellules au galactose n'est guère qu'un cas particulier du problème général de l'accoutumance. Il a l'avantage d'étudier des substances très bien définies comme les sucres. L'organisme animal est susceptible de phénomènes d'accoutumance. Les leucocytes qu'il renferme doivent s'accoutumer aux toxines, à certaines substances telles que le sulfure d'arsenic dans les expériences de Besredka ou encore contre le sérum sanguin dans les expériences de Bordet.

Or, les leucocytes sécrètent des substances antitoxiques ayant les propriétés des diastases, c'est-à-dire d'être destructibles par la chaleur. Comme pour nos levures, cette accoutumance qui

constitue l'immunité est plus ou moins facile suivant l'animal et les substances que le sang renferme. Il est probable, en effet, qu'il existe, comme dans notre cas particulier, des substances se comportant comme l'acide borique, c'est-à-dire empêchant toute accoutumance, tandis que d'autres se comportent comme le sublimé, c'est-à-dire n'empêchant pas l'accoutumance, mais seulement le développement du microbe.

L'antitoxine elle-même acclimate les leucocytes à la toxine, tout en agissant comme antidote de la toxine.

Peut-être existe-t-il encore des toxines ayant entre elles des relations de constitution comme le galactose avec le lactose ou le melibiose, l'immunité conférée par l'une restant acquise pour les autres.

Enfin, comme je l'ai déjà signalé, la diminution de l'accoutumance concorde bien avec la disparition de l'immunité. L'absence de la toxine fait disparaître l'immunité comme l'absence de galactose fait disparaître l'accoutumance à ce sucre.

En résumé, ce travail favorisera peut-être l'étude du problème général de l'acclimation, problème plus délicat; car on ignore même la nature de certains corps qui agissent et auxquels la cellule doit s'accoutumer. La constitution des corps peut varier entraînant avec elle les conditions d'acclimation de la cellule. Le problème étudié avec le galactose avait cette supériorité que ce sucre possède une composition déterminée et susceptible d'aucune variation.

R É S U M É

Voici en peu de mots ce qui résulte de ce travail :

1). Le galactose est bien un sucre fermentescible, comme cela résultait des expériences de MM. Fischer et H. Thierfelder, et Bau.

2). La fermentation du galactose n'est possible que lorsque la levure s'est acclimatée à ce sucre. La durée de l'acclimation varie avec les levures. Elle est faible pour les levures de lactose,

grâce à la présence d'un peu de lactase qui provoque une légère acclimatation.

3). Chez les levures acclimatées, le glucose fermente environ 1,6 fois plus vite que le galactose.

4). Une levure acclimatée perd peu à peu son acclimatation si on lui offre un autre sucre que du galactose, du lactose ou du melibiose. Si on favorise la multiplication, la perte de l'acclimatation se produit au bout de quelques heures.

5). L'effet de l'acclimatation est nulle sur les propriétés morphologiques des levures.

6). Certaines substances empêchent l'acclimatation sans empêcher la fermentation du glucose (BoO^3 , toluène).

7). L'alcool est plus nuisible à la fermentation du galactose qu'à celle des autres sucres.

8). On peut faire perdre la zymase à une levure cultivée dans un milieu riche en peptone. Cette levure perd alors toute faculté de s'acclimater au galactose si on ne la rajeunit pas en présence de glucose. Si elle était acclimatée, elle conserve la propriété de se rajeunir directement en présence du galactose.

9). Quand on cultive une levure dans un milieu nutritif additionné de glucose et de galactose par exemple, on constate que les levures peuvent s'acclimater au galactose en présence du glucose. Cette acclimatation est difficile en présence du levulose.

10). L'acclimatation des levures est accompagnée chez certaines levures d'une sécrétion plus grande de melibiase ou de lactase; la réciproque est également vraie.

11). Nous avons émis l'hypothèse, en nous basant sur nos résultats, qu'il n'y avait qu'une seule zymase qui pouvait se transformer pendant l'acclimatation, de façon à permettre la décomposition du galactose. Ce changement dans la constitution de la zymase est accompagné d'un changement dans la constitution du protoplasma.

Le phénomène de l'acclimatation est donc, dans ce cas, une modification profonde de l'état de la cellule provoquée par un hydrate de carbone très voisin du glucose.

Il doit en être de même des toxines agissant sur les leucocytes.

12). Enfin, jusqu'à nouvel ordre, la notion de fermentation par entraînement doit être considérée comme inexistante.

BIBLIOGRAPHIE

PASTEUR. Etudes sur la fermentation alcoolique. (*Annales de chimie et de physique*, III^e série, N^o 58, page 355.)

FUDAKOWSKI. Vorläufige Mittheilung, betreffend zwei aus dem Milchezucker entstehende Zuckerarten. (*Berichte der deutsch. Chemischen Gesellschaft*, VIII, page 599.)

Id. Zur näheren Kenntniss der Galactose. (*Berichte der deutsch. Chemischen Gesellschaft*, IX, pages 42, 278 et 1602.)

Id. Zur Charakteristik der beiden näheren Milchezucker Abkommlinge. (*Berichte der deutsch. Chemischen Gesellschaft*, XI, page 1069.)

VON LIPPMANN. Ueber die Nichtidentität von Arabinose und Galaktose. (*Berichte der deutsch. Chemischen Gesellschaft*, XVII, page 2238.)

KILIANI. Ueber die Identität von Arabinose und Laktose. (*Berichte der deutsch. Chemischen Gesellschaft*, XIII, page 2304.)

KOCH. *Pharmaceut. Zeitung für Russland*. 25 Jahrg. 1886, n^o 47, page 764.

HERZFELD. Ueber die Gährung der Galaktose. (*Rubenzuckerfabrikation des deutsch. Reiches*, n^o 34, page 1384.)

BOURQUELOT. Sur la fermentation du galactose. (*Comptes rendus*, t. CVI, page 283.)

TOLLENS et STONE. Ueber die Gährung der Galaktose. (*Berichte der deutsch. Chemischen Gesellschaft* 1886.)

A. BROWN. Influence of oxygen and Concentration on alcoholic fermentation. (*Journal Chem. Society*, 1892, page 369.)

J. O'SULLIVAN. The Rate of alcoholic Fermentation. (*Journal Society Chem. Ind.*, 1898, pages 17 et 559.)

Id. On the hydrolytic and fermentation Fonctions of yeast. (*Journal of the federated institut of Brewing March*, 1899.)

E. LAURENT. Nutrition hydrocarbonée et formation de glycogène chez la levure de bière. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, page 113.)

E. KAYSER et BOULLANGER. Sur le glycogène des levures. (*Annales de brasserie et de distillerie*, 1898, page 73.)

CLAUTRIAU. Chemische Studien über das Glykogen der Pilze and der Hefe. T. III., *Mémoires couronnés par l'Académie Royale de Belgique*, 1895, page 95.)

E. SALKOWSKI. Ueber fermentative Prozesse in den Geweben. (*Du Bois Raymond's Archiv.*, 1890, page 554.)

F. HESSENLAND. Ueber die Zusammensetzung des Hefegewemmis. *Zeitschr. des Ver. f. die Rubenzucker-industrie des deutsch. Reiches*. Bd. 42, A. 1892, p. 671.)

O'SULLIVAN. Ueber alkoholische Gährung. (*Zeitsch. für das Ges. Brauwesen*, page 605.)

E. FISCHER. Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. (*Zeitsch. für physiolog. Chemie*, t. XXVI, page 60.)

A. BAU. Ueber die Vergährbarkeit der Galaktose. (*Zeitschrift für Spiritus Industrie*, 1896, n° 38, page 303; n° 39, page 312.)

E. FISCHER et H. THIERFELDER. Verhalten der verschiedenen Zucker gegen reine Hefen. (*Berichte der deutsch. Chemischen Gesellschaft* 1894, Bd. XXVII, page 2031.)

F. VOIT. Ueber das Verhalten der Galactose beim Diabetiker. (*Zeitschrift für Biologie*, t. XXIX, page 147.)

M. CREMER. Ueber die Umlagerungen der Zuckerarten unter dem Einflusse von Ferment und Zelle. (*Zeitschrift für Biologie*, page 183, t. XXXI.)

Id. Demonstration des Hefeglykogenes in den Zellen und als Präparat. (*Munchener und Wochenschrift* 1894, n° 26.)

Id. Ueber Hefe und Leberzelle. (*Munchener und Wochenschrift* 1894, n° 22.)

NEUMANN-WENDER. Die Gresshefe des Handels. *Zeitschrift für Nahrungsmit-
teluntersuchung*, 1896, n° 9 et n° 12.)

E. BUCHNER et RAPP. Alkoholische Gährung ohne Hefezellen. (*Berichte der
deutsch. Chemischen Gesellsch.*, t. XXXI, page 1090.)

E. DUBOURG. Fermentation des Saccharides. (*Comptes rendus*, t. CXXVIII, page 440.)

DUMAS. Recherches sur la fermentation alcoolique. (*Annales de chimie et de
physique*, 1874, 5^e série, t. III, page 81.)

E. FISCHER. Ueber zwei neue Hexite und die Verbindungen der mehrwer-
thigen Alkohol mit dem Bittermandelöl. (*Berichte d. d. Chemischen Gesellsch.*,
page 1525, t. XXIV.)

Id. Synthesen in der Zuckergruppe. (*Berichte d. d. Chemischen Gesellsch.*,
page 3230, t. XXV.)

D^r BESREDKA. Immunité vis-à-vis des composés arsénicaux. (*Annales de
l'Institut Pasteur*, t. XIII, page 49.)

J. BORDET. Mécanisme de l'agglutination. (*Annales de l'Institut Pasteur*,
t. XIII, page 225.)

Id. Agglutination et dissolution des globules rouges par le sérum
(*Annales de l'Institut Pasteur*, t. XIII, page 273.)

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ LA DIALYSE

VU ET APPROUVÉ,

Paris, le 13 janvier 1900.

Le doyen de la Faculté des Sciences,

G. DARBOUX.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER.

Paris, le 13 janvier 1900.

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.

GRÉARD.

SCEAUX. — IMP. E. CHARAIRE

